

UNIVERSITE DE CORSE – PASCAL PAOLI

UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée par

Jean-Baptiste Baïly BASSENE

**IMPLICATIONS DES INTERACTIONS NOYAUX CYTOPLASMES
ET DE L'ALLOPOLYPLOIDISATION SUR L'EXPRESSION
PHENOTYPIQUE ET GENOMIQUE CHEZ LES AGRUMES**

Soutenue le 11 Février 2009

Sous la direction du

Dr. Patrick OLLITRAULT (directeur de thèse)
Dr. Yann FROELICHER (co-directeur de thèse)

JURY :

M. Luis NAVARRO
M. Christian JAY-ALLEMAND
Mme Liliane BERTI
M. Joseph CASANOVA
M. Patrick OLLITRAULT
M. Yann FROELICHER

IVIA de Valencia, Rapporteur
Université Montpellier II, Rapporteur
Université de Corse, Examineur
Université de Corse, Examineur
CIRAD, Examineur
CIRAD, Examineur

REMERCIEMENTS

De la Casamance à la Corse en passant par Dakar, Corte, San Giuliano, Montpellier, Valencia, la route a été longue et parsemée de belles rencontres. Arrivé au bout du chemin, je reprends mon souffle pour écrire ces quelques lignes et exprimer toute ma gratitude,

A la Collectivité Territoriale de Corse pour avoir accepté de financer mon travail de thèse;

A Monsieur Robert Domaingue, Directeur de l'Unité Propre de Recherche Amélioration génétique d'espèces à Multiplication végétative du CIRAD, à Madame Dominique Agostini, Présidente du centre INRA de Corse, et Messieurs Olivier Pailly et Laurent Urban, Directeurs de l'Unité de Recherche Génétique et Écophysiologie de la Qualité des Agrumes de l'INRA de San Giuliano, pour m'avoir accueilli au sein de leurs unités de recherche;

J'adresse mes remerciements à Messieurs Patrick Ollitrault, Chercheur CIRAD, Yann Froelicher, Chercheur CIRAD, pour m'avoir confié ce sujet et pour avoir assuré un encadrement irréprochable. Je leur exprime reconnaissance et gratitude pour les conseils scientifiques et pédagogiques apportés au cours de mon travail, mais aussi de m'avoir permis de goûter à des fruits de combinaisons que vous n'imaginerez jamais!!!

Merci à Madame Claudie Dhuique-Mayer, Chercheur CIRAD, et Mademoiselle Gema Ancillo, de l'IVIA de Valencia qui m'ont encadré respectivement pour les parties caroténoïdes et microarrays de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame Liliane Berti, Professeur à l'Université de Corse, Monsieur Joseph Casanova, Professeur à l'Université de Corse, et Monsieur Raphael Morillon, Chercheur CIRAD, pour leur participation à mon comité de thèse et pour leurs conseils scientifiques.

Je remercie particulièrement Messieurs Luis Navarro, Directeur de l'IVIA, Christian Jay-Allemand, Professeur à l'université Montpellier II, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens également à remercier Messieurs Franck Curk, Ingénieur d'études à l'INRA de San Giuliano, Camille Jacquemond, Ingénieur de recherche à l'INRA de San Giuliano, pour leur soutien lors de la caractérisation pomologique des hybrides.

Toute ma reconnaissance à Mademoiselle Elodie Carcouët, pour tout le temps passé sur la relecture de cette thèse, et pour son encadrement en HPLC.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Gilles Costantino, pour m'avoir encadré et soutenu dans les manips de biologie moléculaire et l'utilisation des outils d'analyse informatique, et également à Mademoiselle Anne-Laure Fanciullino pour sa disponibilité et ses conseils sur les caroténoïdes.

Merci à ma super stagiaire, Camille Carcouet, pour ses manips impeccables et l'entrain qu'elle a mis à les réaliser.

Gracias Thierry Allario, pour m'avoir hébergé à valencia, Rosa Mar Ferrer y Wafa Mouhaya, pour le complément de manips PCR Quanti, Caroline Belzile, pour tous les moments de vadrouille en Espagne, Andres y a todos los becarios del IVIA.

Merci à Bruno et Alex, vous m'avez tout donné durant ces cinq années... à mes frères du BSI, Sajjad Hussain et Mourad Kamiri, vous allez me manquer... ma titeMo, merci pour ton soutien et ta gentillesse dans les durs moments... au soleil du BSI en 2004, Rest in Peace "salutu!!!"... à tous ceux qui sont passés au BSI, pour les bons et pires moments passés ensemble... à Sandrine et Florine, pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de l'INRA de San Giuliano (Thésards, SDAR, Terrain, Bibliothèque, Accueil, Informatique, Chercheurs et Techniciens) pour leur bonne humeur qui ajouté au beau temps de la Corse me rappelle mon petit chez moi en Casamance.

Familles Bazo, Sagna et Diatta, vos encouragements à des lieux d'ici m'ont aidé à tenir le cap.

L'avenir appartient à ceux qui se lèvent tôt dit-on, Clémence et Moïse, pour celui de vos petits chéris vous n'avez jamais fermé l'œil. Je vous dédie ce travail.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	13
I.1. LE MONDE DES AGRUMES	13
I.1.1. Origine et dispersion	13
I.1.2. Importance Economique des agrumes	14
I.1.3. Taxonomie et Diversité	15
I.1.4. Système de reproduction	16
I.1.5. La ploïdie des agrumes	18
I.1.5.1. Mécanismes de formation des polyploïdes spontanés chez les agrumes	18
I.1.5.2. Caractéristiques morphologiques des autotétraploïdes d'agrumes	18
I.2. SELECTION ET AMELIORATION DES AGRUMES	20
I.2.1. Généralités	20
I.2.2. Amélioration des porte-greffes	20
I.2.3. Amélioration des variétés	21
I.3. L'HYBRIDATION SOMATIQUE CHEZ LES AGRUMES	24
I.3.1. Principe de l'hybridation somatique	24
I.3.1.1. La fusion chimique	24
I.3.1.2. L'électrofusion	24
I.3.2. Les produits de la fusion de protoplastes	25
I.3.2.1. Les hybrides somatiques allotétraploïdes	25
I.3.2.2. Les hybrides asymétriques aneuploïdes	25
I.3.2.3. Les cybrides	25
I.3.3. Caractérisation des hybrides somatiques	25
I.3.3.1. Caractérisation du génome nucléaire	26
I.3.3.2. Caractérisation du génome cytoplasmique	27
I.3.4.2. La création directe d'hybrides triploïdes	29
I.3.4.3. La création d'hybrides allotétraploïdes	30
I.4. DE NOUVELLES QUESTIONS DE RECHERCHES SUR LES DETERMINANTS DE LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE	31
I.4.1. Les interactions nucléo-cytoplasmiques	31
I.4.1.1. Les interactions noyau-mitochondrie	31
I.4.1.2. Les interactions noyau-chloroplaste	33
I.4.1.3. L'expression phénotypique chez les cybrides d'agrumes	35

I.4.2. Allopolyploïdie et expression génomique et phénotypique.....	36
I.4.2.1. L'identification des plantes polyploïdes.....	37
I.4.2.2. Les modifications génétiques liées à la polyploïdisation.....	38
I.4.2.3. Les modifications épigénétiques liées à la polyploïdisation.....	39
I.4.2.4. Expression génomique et phénotypique chez les hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes	40
I.5. LES DETERMINANTS DE LA QUALITE DU FRUIT	43
I.5.1. Les sucres et les acides organiques	43
I.5.1.1. Généralité sur les sucres et acides organiques de la pulpe des agrumes.....	43
I.5.1.2. Métabolisme des sucres et des acides organiques.....	44
I.5.2. Les caroténoïdes.....	47
I.5.2.1. Généralité sur les caroténoïdes	47
I.5.2.2. Métabolisme des caroténoïdes	48
I.5.3. Les arômes	50
I.5.3.1. Généralité sur les arômes des fruits des agrumes	50
I.5.3.2. Métabolisme des composés d'arôme	50
I.6. LES OBJECTIFS DE LA THESE	52
II. MATERIELS ET METHODES	54
II.1. MATERIEL VEGETAL.....	54
II.2. CARACTERISATION GENETIQUE DES HYBRIDES SOMATIQUES.....	54
II.2.1. Evaluation de la ploïdie	54
II.2.1.1. Cytométrie en flux.....	54
II.2.1.2. Comptage chromosomique	55
II.2.2. Caractérisation des génomes nucléaires et cytoplasmiques	55
II.2.2.1. Extraction d'ADN.....	55
II.2.2.2. Amplification des ADN par PCR	55
II.2.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	56
II.2.2.4. Marqueurs microsatellites nucléaires	57
II.2.2.5. Marqueurs mitochondriaux et chloroplastiques	58
II.3. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES HYBRIDES	59
II.3.1. Description des feuilles	59
II.3.2. Description des fleurs	59
II.3.3. Description des fruits.....	60
II.4. EVALUATION DE LA QUALITE DES FRUITS	60

II.4.1. Sucres et acides organiques	60
II.4.1.1. Mesure de l'acidité titrable et de l'extrait sec soluble (° Brix)	60
II.4.1.2. Dosage des acides organiques et des sucres	61
II.4.2. Les caroténoïdes	61
II.4.2.1. Extraction des caroténoïdes	62
II.4.2.2. Dosage des caroténoïdes	62
II.5. ETUDE DU TRANSCRIPTOME	63
II.5.1. Extraction et quantification des ARN totaux	63
II.5.2. Amplification et quantification des ARNm par PCR en temps réel	63
II.5.3. Analyses Microarrays	65
II.5.3.1. Amplification et marquage des ARNa	65
II.5.3.2. Hybridation des lames microarray et acquisition des données	65
II.5.3.3. Analyse des données microarray	66
II.6. ANALYSES STATISTIQUES	66
III. RESULTATS ET DISCUSSION	67
III.1. CARACTERISATION DES GENOMES NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES DES HYBRIDES SOMATIQUES	67
III.1.1. Introduction	67
III.1.2. Résultats	68
III.1.2.1. Evaluation du niveau de ploïdie par cytométrie en flux et comptage chromosomique	68
III.1.2.2. Caractérisation du génome nucléaire	69
III.1.2.3. Caractérisation du génome mitochondrial	70
III.1.2.4. Caractérisation du génome chloroplastique	70
III.1.3. Discussion	71
III.2. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE COMPAREE DU CYBRIDE ET DE SES PARENTS	73
III.2.1. Introduction	73
III.2.2. Résultats	74
III.2.2.1. Description des feuilles	74
III.2.2.2. Description des fleurs	76
III.2.2.3. Description des fruits	77
III.2.3. Discussion	80

III.3. INFLUENCE DE L'ORIGINE DES MITOCHONDRIES SUR LA QUALITE DES FRUITS CHEZ UN CYBRIDE D'AGRUMES	82
III.3.1. Résumé de l'article	82
III.3.2. Article.....	83
III.4. ANALYSE COMPARATIVE DU TRANSCRIPTOME DU CYBRIDE ET DU CITRONNIER.....	90
III.4.1. Introduction	90
III.4.2. Résultats	91
III.4.2.1. Différences transcriptionnelles entre le citronnier Eureka et WLM + EUR 2x	91
III.4.2.2. Classification fonctionnelle des gènes surexprimés chez le cybride.....	92
III.4.2.3. Classification fonctionnelle des gènes réprimés chez le cybride	94
III.4.3. Discussion	95
III.5. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE COMPAREE DE L'HYBRIDE ALLOTETRAPLOÏDE ET DE SES PARENTS	98
III.5.1. Introduction	98
III.5.2. Résultats	98
III.5.2.1. Description des feuilles	99
III.5.2.2. Description des fleurs.....	100
III.5.2.3. Description des fruits	102
III.5.2.4. Classification hiérarchique.....	104
III.5.3. Discussion	105
III.6. TRANSMISSION DE CARACTERES IMPLIQUES DANS LA QUALITE DU FRUIT CHEZ UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERSPECIFIQUE D'AGRUMES	107
III.6.1. Résumé de l'article	107
III.6.2. Article.....	108
III.7. LA COMPOSITION DES CAROTENOÏDES DE LA PULPE DE L'HYBRIDE ALLOTETRAPLOÏDE EST CORRELEE AVEC UNE EXPRESSION NON ADDITIVE DES GENES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES	127
III.7.1. Résumé de l'article	127
III.7.2. Article.....	128
III.8. REGULATION NON ADDITIVE DE L'EXPRESSION DES GENES CHEZ L'HYBRIDE SOMATIQUE ALLOTETRAPLOÏDE.....	152
III.8.1. Résumé de l'article	152

III.8.2. Article.....	153
IV. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	183
IV.1. DISCUSSION GENERALE	183
IV.1.1. Impact du génome cytoplasmique sur la régulation du transcriptome et l'élaboration du phénotype	183
IV.1.1.1. La mitochondrie dans l'élaboration de la morphologie florale, foliaire et du fruit.....	183
IV.1.1.2. Les effets de la mitochondrie dans l'élaboration de la qualité des fruits.....	185
IV.1.1.3. Mitochondrie et régulation du génome nucléaire	187
IV.1.2. Expression du génome et élaboration du phénotype chez les allopolyploïdes d'agrumes.....	190
IV.1.2.1. Effets de l'allopolyploïdisation sur le phénotype: contribution inégale des parents à l'élaboration des caractères phénotypiques	190
IV.1.2.2. Une expression non additive du transcriptome concordante avec l'absence de codominance pour l'hérédité de nombreux caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes	192
IV.2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	195
IV.2.1. Effet de l'interaction génome nucléaire-génome mitochondrial sur l'élaboration du phénotype et l'expression génomique.....	195
IV.2.1.1. Influence de l'origine de la mitochondrie sur le phénotype.....	195
IV.2.1.2. Effet de la mitochondrie sur l'expression des gènes d'origine nucléaire ...	196
IV.2.2. Les perspectives pour l'amélioration des agrumes.....	197
IV.2.3. Effet de l'allopolyploïdisation sur l'élaboration du phénotype et l'expression génétique	198
IV.2.3.1. Elaboration du phénotype chez un allotétraploïde.....	198
IV.2.3.2. Expression du transcriptome chez un allotétraploïde	198
IV.2.4. Perspectives de l'allotétraploïdisation pour l'amélioration des agrumes.....	200
V. REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201
VI. ANNEXES	225

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde	13
Figure 2: Taxonomie des <i>Aurantioideae</i>	16
Figure 3: Schéma de fleur d'agrumes en coupe verticale.....	17
Figure 4: Produits de la fusion de protoplastes	26
Figure 5: Phénomènes d'allopolypléidisation naturels d'après Chen (2007)	37
Figure 6: Représentation schématique du métabolisme des sucres	45
Figure 7: Voie schématique du métabolisme de l'acide citrique	46
Figure 8: Mécanisme d'utilisation du citrate à la maturité du fruit.....	47
Figure 9: Schéma général de la biosynthèse des caroténoïdes chez les agrumes.	49
Figure 10: Biosynthèse des terpénoïdes.....	51
Figure 11: Détermination de la pléidie par cytométrie en flux.....	68
Figure 12: Comptages chromosomiques sur feuille en métaphase.	69
Figure 13: Caractérisation des génomes nucléaires des hybrides	69
Figure 14: Caractérisation des génomes mitochondriaux des hybrides	70
Figure 15: Caractérisation des génomes chloroplastiques des hybrides	70
Figure 16: Morphologie des feuilles du cybride.	75
Figure 17: Morphologie des fleurs du cybride.....	77
Figure 18: Coupe transversale des fruits du cybride.....	79
Figure 19: Scan de lame cDNA microarray 20 K <i>Citrus</i>	91
Figure 20: Distribution en catégories fonctionnelles des gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x.....	92
Figure 21: Visualisation des voies métaboliques.....	93
Figure 22: Morphologie des feuilles de l'hybride allotétraploïde	100
Figure 23: Morphologie des fleurs de l'hybride allotétraploïde.....	101
Figure 24: Coupe transversale des fruits de l'hybride allotétraploïde	102
Figure 25: Dendrogramme obtenu à partir des données morphologiques quantitatives	104

1^{er} Article

Figure 1: Analysis of genetic constitution of WLM + EUR 2x	85
Figure 2: Organic acid levels in fruit pulp during the mature stage.....	86
Figure 3: Sugar levels in fruit pulp during the mature sta.....	86

2^{ème} Article

Figure 1: Metaphase of the tetraploid somatic hybrid WLM + EUR 4x	123
Figure 2: Analysis of the genetic structure of WLM + EUR 4x	123
Figure 3: Organic acid levels in fruit pulp during the mature stage.....	124
Figure 4: Sugar levels in fruit pulp during the mature stage.....	125
Figure 5: Dendrogram of cluster analysis with amounts of aromatic compounds.....	126

3^{ème} Article

Figure 1: Carotenoid biosynthetic pathway in fruit chromoplasts	150
Figure 2: Fruits of Eureka lemon (left), allotetraploid hybrid (middle) and Willow leaf mandarin (right).....	151
Figure 3: Dendrogram constructed according to Ward method using Euclidean distance ..	151

4^{ème} Article

Figure 1: Phylogenetic origin of the somatic allotetraploid hybrid	176
Figure 2: Comparison of global genes expression level	177
Figure 3: Allotetraploid hybrid gene expression distribution	178
Figure 4: Cluster analysis (UPGMA) based in Euclidian distances	179
Figure 5: Classification of genes from group 1 among GO	180
Figure 6: Classification of genes from group 2 among GO	181
Figure 7: Classification of the 34 transgressive genes among GO	182

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition du mélange PCR.....	56
Tableau 2: Liste des amorces SSR nucléaires utilisés pour la caractérisation des hybrides...	57
Tableau 3: Marqueurs PCR mitochondriaux	58
Tableau 4: Marqueurs SSR chloroplastiques.....	59
Tableau 5: Amorces des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.....	64
Tableau 6: Programme PCR en temps réel	64
Tableau 7: Caractères foliaires du cybride comparé à ses parents.....	74
Tableau 8: Caractères floraux du cybride comparé à ses parents	76
Tableau 9: Caractéristiques des fruits du cybride comparé à ses parents	78
Tableau 10: Caractères foliaires de l'hybride somatique comparés à ses parents.....	99
Tableau 11: Caractères floraux de l'hybride somatique comparés à ses parents	101
Tableau 12: Caractéristiques des fruits de l'hybride somatique comparées à ses parents	103
Tableau 13: Gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x comparés au citronnier.....	225
Tableau 14: Gènes réprimés chez WLM + EUR 2x comparés au citronnier.....	235

1^{er} Article

Table 1: Carotenoid Contents (mg/L)	87
--	----

2^{ème} Article

Table 1: Chemical composition of peel oils.....	122
--	-----

3^{ème} Article

Table 1: Primers used for gene expression analysis by real time RT-PCR.....	148
Table 2: Carotenoids content (milligrams per liter)	149
Table 3: mRNA levels.....	149

4^{ème} Article

Table 1: Significantly enriched genes from group 2 compared to the reference.....	175
--	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA: acide abscissique	ISSR: inter simple sequence repeat
ADN: acide désoxyribonucléique	KH ₂ PO ₄ : potassium dihydrogen phosphate
ADNc: ADN complémentaire	
ADP: adénosine di phosphate	LCY-b: lycopène β -cyclase
AFLP: amplified fragment length	LCY-e: lycopène ϵ -cyclase
ARN: acide ribonucléique	
ARNa: acide ribonucléique antisens	MEP: 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate
ARNm: ARN messager	MSAP: methylation-sensitive amplification
ATP: adénosine triphosphate	polymorphism
	MTBE: methyl tert-butyl ether
BHT: <i>ter</i> -butylhydroxytoluène	MVA: mévalonate
CAPS: cleaved amplified polymorphic	NADP: nicotinamide adénine dinucléotide
CMS: cytoplasmic male sterile	phosphate
CRTISO: caroténoïde isomérase	NADPH: nicotiamine adénine dinucléotide
sequence	phosphate (forme réduite)
	NCED: 9- <i>cis</i> -époxy hydroxy caroténoïde
DAPI: di aminido phenyl indol	dioxygénase
DEPC: pyrocarbonate de diéthyle	NSY: néoxanthine synthétase
DMAPP: diphosphate de diméthylallyle	
dNTP: Désoxynucléotides triphosphate	
isoméro-réductase	ORF: open reading frame
DXS: 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate	
synthétase	PEG: Polyéthylène glycol
	PCR: Polymerase Chain Reaction
EDTA: ethylenedinitro tetraacetic acid	PDS: phytoène désaturase
	PSY: phytoène synthétase
FPP: diphosphate de farnésyle	
FISH: fluorescence in situ hybridization	RAPD: randomly amplified polymorphic
FDR: false discovery rate	RFLP: restriction fragment length
	polymorphism
GABA: acide gamma-amino butyrique	Rf: fertility restorer
GC: gas chromatography	RMN: résonance magnétique nucléaire
GC/MS: gas chromatography/mass	RT-PCR: reverse transcription-PCR
spectrometry	
GISH: genomic in situ hybridization	SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
GGPP: diphosphate de géranylgéranyle	SSCP: single strand conformation
GGPS: diphosphate de géranylgéranyle	polymorphism
synthétase	SSR: simple sequence repeats
GO: gene ontology	STMS : sequence-tagged microsatellites
GPP: diphosphate de géranyle	SSC: Salt Sodium Citrate
GPPS: diphosphate de géranyle synthétase	SAM: significance analysis of microarrays
HPLC: chromatographie liquide haute	UPOV: union de protection des obtentions
performance	végétales
HY-b: β -carotène hydroxylase	
HY-e: ϵ -carotène hydroxylase	VDE: violaxanthine de-époxydase
IPP: diphosphate d'isopentényle	WLM + EUR: willow leaf mandarin + eureka
isomérase	
IPGRI: international plant genetic resources	ZDS: ζ -carotène désaturase
institute	ZEP: zéaxanthine époxydase

I. INTRODUCTION

I.1. LE MONDE DES AGRUMES

I.1.1. Origine et dispersion

Cultivés tout autour du monde entre 40° de latitude nord et sud, la zone d'origine des agrumes se situe dans les régions tropicales et subtropicales du sud-est asiatique, du nord-est de l'Inde, du sud de la Chine, de la péninsule Indochinoise et de l'archipel Malais (Nicolosi, 2007). Leur diffusion vers les autres continents s'est faite avec les grands événements historiques tels que les conquêtes Grecques et Romaines en Asie mineure et au Moyen Orient pour le cédrat, l'expansion de la civilisation islamique et les croisades pour les agrumes acides, les échanges commerciaux avec l'introduction des orangers par les Portugais à partir de la Chine et les grandes découvertes (Figure 1).

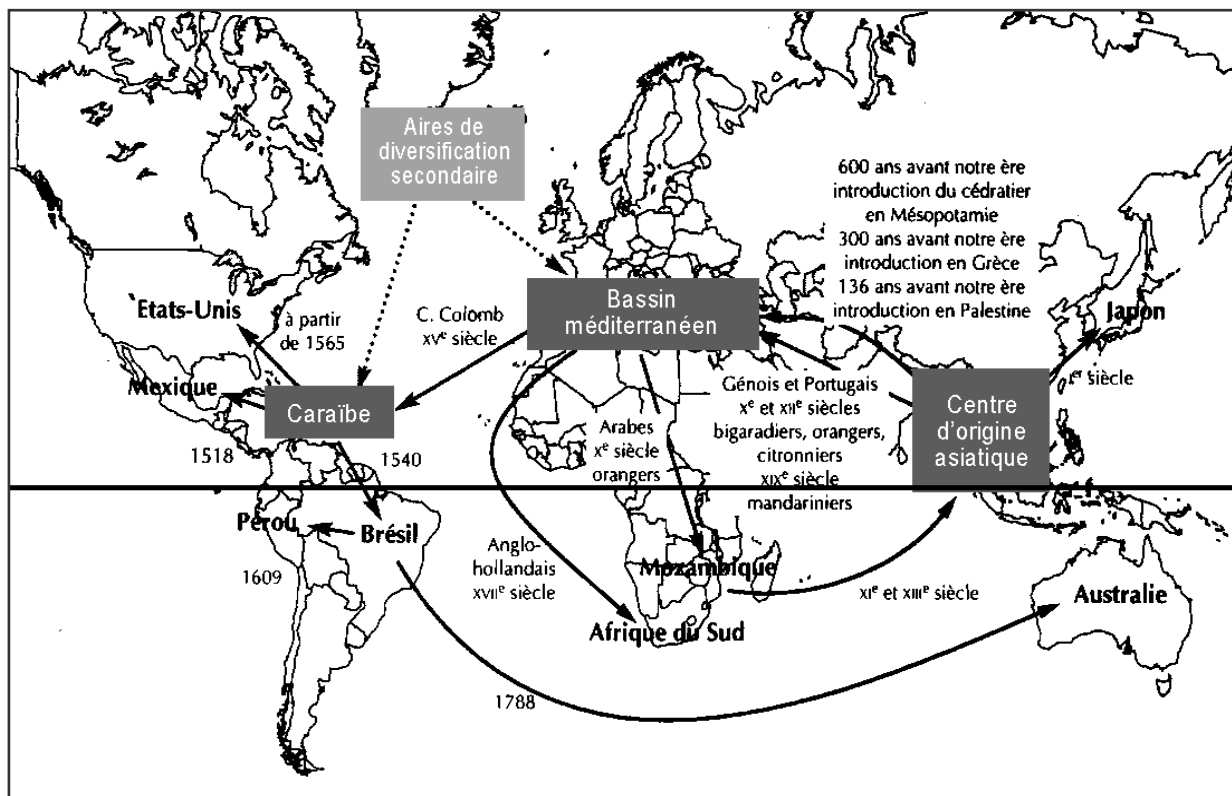


Figure 1: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, Ollitrault *et al.* (2003)

Le cédratier (*Citrus medica* L.), première espèce introduite en Europe vers 300 ans avant J. C., est ainsi la première espèce cultivée dans le Bassin Méditerranéen. Les autres espèces n'y ont été introduites que durant le second millénaire. Le bigaradier ou oranger amère (*C. aurantium* L.) a été introduit en Afrique depuis l'Inde, par les Arabes, puis diffusé autour de la Méditerranée. Le Bassin Méditerranéen constitue également une importante zone de diversification secondaire pour les orangers (*C. sinensis* (L.) Osbeck), les mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et les citronniers (*C. limon* (L.) Burm.). Les agrumes introduits en Amérique après la découverte du nouveau monde par Christophe Colomb donneront naissance au pomelo (*C. paradisi* Macf.), la seule espèce non originaire d'Asie.

I.1.2. Importance Economique des agrumes

La production et la consommation mondiale d'agrumes n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. Avec une production mondiale d'environ 115 millions de tonnes en 2006-2007 (source FAO), les agrumes sont au premier rang des productions fruitières devant la banane (81 millions de tonnes) et largement devant le raisin et la pomme (respectivement 66 et 64 millions de tonnes).

Les principaux producteurs sont le Brésil (20,6 MT), la Chine (19,6 MT), les USA (10 MT), le Mexique (6,8 MT), l'Inde (6,2 MT) et l'Espagne (5,7 MT). Sao Paulo et la Floride restent les deux plus grandes régions productrices au monde avec une production essentiellement constituée d'oranges. L'orange représente une très large part de la production mondiale d'agrumes (55,2 %), suivie du groupe des petits agrumes (mandarines, et clémentines: 23 %), des citrons et des limes (11,2 %), des pomelos et pamplemousses (4,4 %), et les autres agrumes (6,2 %). Environ 70% de la production est destinée au marché du fruit frais et environ 30% de la production alimente l'industrie du jus. Dans le Bassin Méditerranéen et en Chine, la majorité de la production est destinée au marché du fruit frais contrairement aux USA et au Brésil où la majorité de la production est vouée à la transformation. Ces dernières années, la production a tendance à stagner dans certaines grandes zones agrumicoles telles que le Brésil et les USA. En effet, l'agrumiculture est confrontée à des contraintes biotiques et abiotiques qui représentent de sérieuses menaces pour la production. La production des deux plus grands pays producteurs (Brésil et Etats-Unis) est aujourd'hui affectée par deux bactérioses: le chancre citrique (*Xanthomonas campestris*) et le 'Huanglongbing' (*Liberobacter asiaticum*). En Afrique, la cercosporiose (maladie fongique due à *Phaeomaria angolensis*) est une contrainte majeure en expansion rapide. La fragilité des productions face

aux maladies émergentes et invasives est d'autant plus grande que les productions majeures (oranger en particulier) reposent sur une diversité génétique très faible. La raréfaction des ressources en eau et la dégradation de sa qualité (salinité en particulier) sont des contraintes abiotiques majeures pour de nombreux pays du Sud.

La production agrumicole doit par ailleurs répondre à l'attente des consommateurs qui sont de plus en plus exigeants en termes de qualité. Des politiques de segmentation du marché sont mises en place dans le secteur des petits agrumes. Pour le marché du fruit frais, l'absence de pépins et la coloration des fruits sont des critères de qualité essentiels.

I.1.3. Taxonomie et Diversité

Les agrumes font parties des *Rutaceae*, l'une des 21 familles qui compose l'ordre des Géraniales. Les *Rutaceae* comprennent 1600 espèces et 150 genres regroupés en 7 sous familles et 12 tribus. Le terme "agrumes vrais" regroupe six genres sexuellement compatibles de la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* (Figure 2). La majorité des espèces consommées appartiennent au genre *Citrus*. Le genre *Fortunella* rassemble deux à sept espèces selon les auteurs (les kumquats). Le genre *Poncirus*, renferme une seule espèce, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., caractérisée par des feuilles caduques et trifoliées. Elle est utilisée comme porte-greffe du fait de ses nombreuses résistances aux contraintes biotiques et de ses fruits non comestibles.

La taxonomie des agrumes est assez confuse et controversée, en raison d'une grande compatibilité sexuelle (hybrides intra et intergénériques), de la fréquence élevée des mutations, d'un long passé de culture et de dispersion (Nicolosi *et al.*, 2000). Ce groupe est générateur de nouveaux génotypes hybrides, fixés par l'apomixie, souvent décrits comme espèces. Le nombre d'espèces et de variétés, l'appartenance de certaines variétés à telle espèce donnent lieu à des divergences d'opinions entre spécialistes de la taxonomie. Les premières études de classification des agrumes se sont basées principalement sur les caractéristiques morphologiques. De nombreuses classifications ont été proposées, mais celles de Swingle et Reece (Swingle et Reece, 1967) et Tanaka (Tanaka, 1961) sont les plus largement utilisées. Ces deux auteurs ont des visions différentes en ce qui concerne la classification des espèces ; ainsi la classification de Swingle identifie 16 espèces, là où celle de Tanaka en décrit 156. L'hypothèse actuelle va en faveur de 4 principaux taxons (au sein des agrumes cultivés), cédratier (*Citrus medica*), mandarinier (*C. reticulata*), pamplemoussier (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) et micrantha (*Citrus micrantha* Wester), à partir desquels dériveraient toutes les autres espèces par hybridations. Cette hypothèse est confortée par les

résultats d'études ayant recours aux marqueurs biochimiques et moléculaires tels que les isozymes, les microsatellites et l'analyse des génomes cytoplasmiques (Froelicher *et al.*, Submitted; Luro *et al.*, 2001; Nicolosi *et al.*, 2000). Ainsi, les orangers (*C. sinensis*) et bigaradiers (*C. aurantium*) résulteraient probablement de backcross entre le pool des pamplemoussiers et celui des mandariniers tandis que le citronnier (*C. limon*) serait un hybride entre bigaradier et cédratier, et le pomelo (*C. paradisi*) un hybride entre oranger et pamplemoussier (Nicolosi *et al.*, 2000). Il est à noter qu'orangers, bigaradiers, citronniers et pomelos ont des organites cytoplasmiques venant du pool pamplemoussier (Froelicher *et al.*, Submitted; Nicolosi *et al.*, 2000).

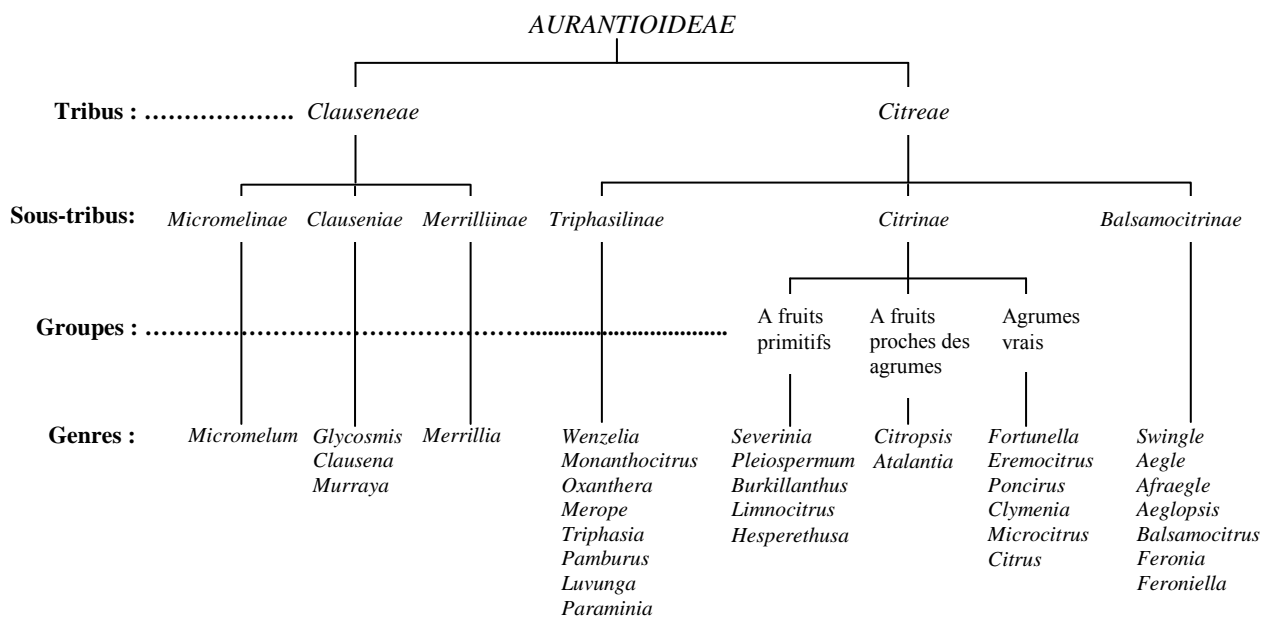


Figure 2: Taxonomie des *Aurantioideae*, d'après Swingle et Reece (1967)

I.1.4. Système de reproduction

Chez les agrumes, la fleur est de type hermaphrodite (Figure 3). Elle est formée de 3 à 5 sépales qui constituent le calice, de 4 à 8 pétales blancs ou légèrement pourpres qui constituent la corolle et des appareils reproducteurs mâles (étamines) et femelles (pistil).

Le système de reproduction des agrumes se caractérise par une grande diversité de comportements. La polyembryonnie ou apomixie facultative de nombreux génotypes, constitue sans doute sa plus grande originalité. Seuls les Cédratiers (*Citrus medica* L.), Pamplemoussiers (*Citrus maxima*), ainsi que quelques variétés de Mandariniers telles que le

Clémentinier (*Citrus clementina* Hort., ex Tan.) et le Mandarinier Fortune (*Citrus reticulata* Blanco) sont monoembryonnés (Swingle et Reece, 1967).

La polyembryonnie a limité considérablement les brassages génétiques en induisant dans les semis, des fréquences très élevées de multiplications conformes du génotype maternel (Ollitrault et Serra, 1992). Les graines renferment plusieurs embryons : un embryon sexué, zygotique, et des embryons nucellaires issus du développement de cellules somatiques du nucelle. Les embryons nucellaires ont le même stock génétique que le géniteur femelle ; ils reproduisent donc de façon identique ses caractères phénotypiques. Ils se développent généralement plus vite que l'embryon zygotique, ce qui entraîne en général l'atrophie ou l'avortement de ce dernier (Aubert et Vullin, 1997).

Une autre des particularités des agrumes est la stérilité gamétique. Elle peut affecter aussi bien les pièces mâles ou femelles de la fleur. La stérilité gamétique est soit d'ordre génétique (Yamamoto *et al.*, 1997), soit d'ordre physiologique sous l'influence des facteurs environnementaux comme les basses températures (Iwamasa, 1966). Ces particularités posent problèmes à l'amélioration des agrumes car elles limitent les possibilités d'hybridation. Par contre, elles permettent en combinaison avec la parthénocarpie, l'obtention de cultivars à fruits sans pépins.

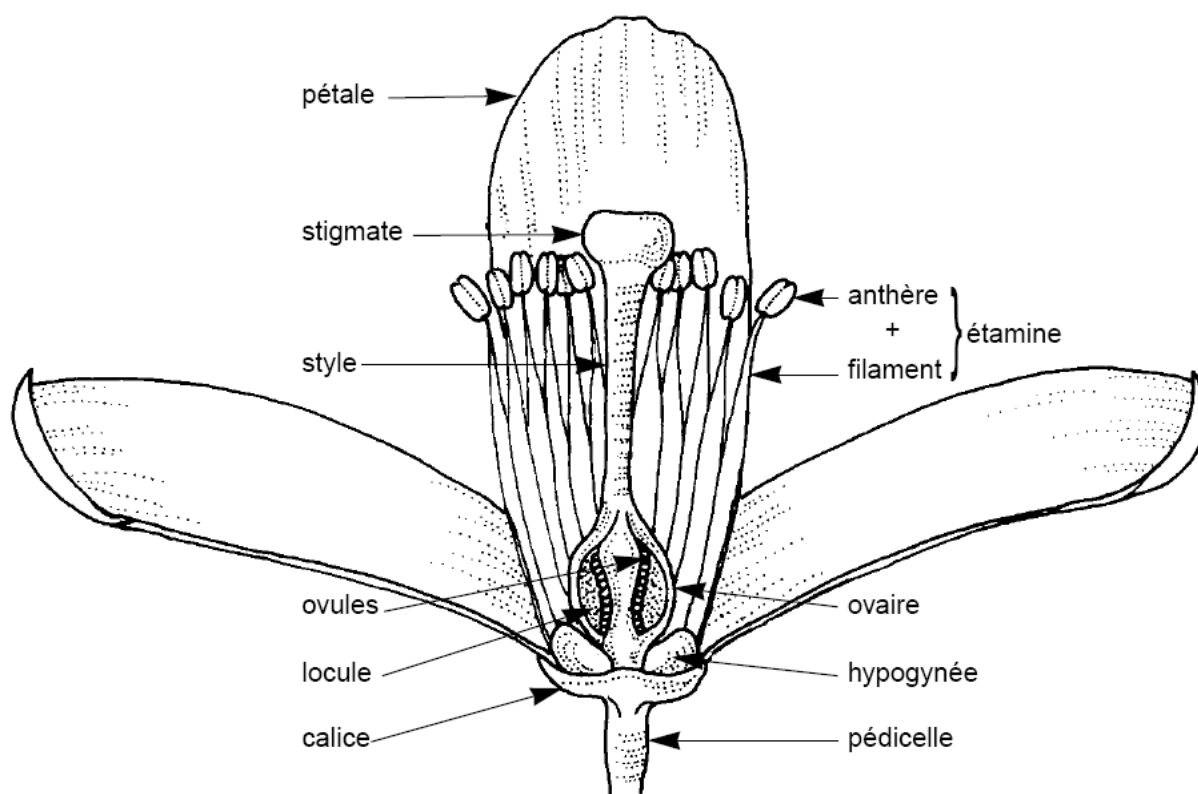


Figure 3: Schéma de fleur d'agrumes en coupe verticale (descripteur IPGRI)

I.1.5. La ploïdie des agrumes

Les agrumes et les genres apparentés ont un nombre de chromosomes de base n égal à 9 et la grande majorité est diploïde, soit $2n = 2x = 18$ (Krug, 1943). Des phénomènes de polyploïdisations naturels peuvent survenir, mais seuls quelques polyploïdes naturels ont été identifiés. Nous pouvons citer l'exemple du tétraploïde *Fortunella hindsii* (Longley, 1925), du triploïde *Citrus latifolia* (Jackson et Sherman, 1975), de l'allotétraploïde *Clausena excavata* et de l'hexaploïde *Glycosmis pentaphylla* (Froelicher *et al.*, 2000).

I.1.5.1. Mécanismes de formation des polyploïdes spontanés chez les agrumes

D'une manière générale, deux mécanismes interviennent dans l'apparition de polyploïdes spontanés chez les agrumes. Le premier mécanisme est la formation de $2n$ gamètes, gamètes non réduits, qui va favoriser la formation de triploïdes et des allotétraploïdes dans les croisements sexués. Chez les agrumes les $2n$ gamètes sont quasi exclusivement d'origine maternelle (Esen et Soost, 1971; Luro *et al.*, 2004). La fréquence de gamètes femelles non réduit varie suivant les génotypes entre moins de 1% à près de 20% (Iwamasa et Nito, 1988).

Le second mécanisme est un doublement du lot de chromosomes sans division cellulaire, donnant naissance à des autotétraploïdes. Dans les semis de graines polyembryonnées, la fréquence des tétraploïdes spontanés varie de 1 à 3 % (Barrett et Hutchinson, 1978). Ces tétraploïdes seraient issus d'un doublement des tissus nucellaires de l'ovule (Cameron et Soost, 1969). Ainsi, on retrouve souvent aussi bien des plantules diploïdes et tétraploïdes provenant de la germination d'une même graine polyembryonnée.

I.1.5.2. Caractéristiques morphologiques des autotétraploïdes d'agrumes

Une des conséquences les plus remarquables de la polyploïdisation est l'augmentation du volume cellulaire (Cavalier-Smith, 1978), qui se traduit par la formation d'organes végétatifs et reproductifs plus grossiers comparés à ceux des diploïdes (Otto et Whitton, 2000). Ainsi, les observations faites par Cameron et Frost (Cameron et Frost, 1968) sur des autotétraploïdes montrent que leurs feuilles sont plus épaisses et plus foncées que celles des diploïdes. La croissance des tétraploïdes est plus lente et la canopée moins développée et plus compacte. Les tétraploïdes présentent généralement une phase juvénile plus longue et sont souvent moins fructifères que les diploïdes. La plupart du temps, la forme du fruit est irrégulière et l'écorce est plus rugueuse avec des glandes à huile proéminentes. En ce qui

concerne la qualité des fruits, seul le pourcentage de jus semble être affecté, en diminuant chez les tétraploïdes. En revanche, les arômes, l'acidité et les sucres ne sont quasiment pas affectés (Ollitrault *et al.*, 2008). Le nombre de pépins par fruit est généralement plus faible de même que le nombre d'embryons par pépin. Les pépins sont toutefois plus gros que ceux des diploïdes. Le citronnier Lisbonne tétraploïde constitue une exception en produisant de gros fruits contenant plus de pépins que son parent diploïde. Ces observations sont confirmées d'une manière générale par des études plus récentes. Barrett (1992) décrit un autotétraploïde du limettier Key présentant des feuilles plus foncées et des fruits plus gros avec les mêmes arômes que le diploïde parental. Les lignées autotétraploïdes de *Poncirus trifoliata* utilisées comme porte-greffe confèrent une vigueur réduite à l'arbre (Jacquemond et Blondel, 1986). Un autotétraploïde de *Citrus volkameriana* présente une croissance très affectée (Ollitrault et Jacquemond, 1995) tandis que la vigueur du mandarinier 'Kinnow' autotétraploïde est peu affectée (Khan *et al.*, 1992). Les plants tétraploïdes issus de semis ont plus d'épines que les plants diploïdes et sur une plus longue durée. L'augmentation de la taille des stomates et la diminution de leur densité sont également généralisées chez les polyploïdes (Beck *et al.*, 2003). Ainsi, ces auteurs suggèrent par ailleurs que l'épaisseur des feuilles, la taille et la densité stomatique sont de bons marqueurs morphologiques pour sélectionner les tétraploïdes spontanés dans les semis nucellaires.

I.2. SELECTION ET AMELIORATION DES AGRUMES

I.2.1. Généralités

Au cours des siècles, l'homme a choisi, propagé et amélioré les plantes cultivées pour nourrir les populations en expansion. La plupart des fruits, légumes et céréales disponibles sur les marchés sont le résultat des activités des sélectionneurs. Les agrumes n'échappent pas à cette règle. L'essentiel des variétés d'agrumes cultivées aujourd'hui à travers le monde sont issues de sélection clonale successive de mutations spontanées identifiées en vergers. Depuis le début du 20^e siècle, de longs cycles de recherche ou d'induction de variabilité (prospection de mutations de rameaux en verger, hybridation, mutagenèse, biotechnologies...), suivis de processus de sélection/validation ont été conduits par différentes équipes à travers le monde.

Les programmes d'amélioration ont exploité la facilité des agrumes à s'hybrider entre eux pour pouvoir améliorer les caractères agronomiques ou pomologiques de certaines variétés défaillantes. En effet, la compatibilité sexuelle c'est avérée très large, tant pour les combinaisons intra et interspécifiques qu'intergénériques. De plus, le perfectionnement des techniques horticoles a permis de contourner diverses contraintes environnementales (salinité, pression parasitaire...) par l'utilisation en plantations d'agrumes, de l'association cultivar / porte-greffes (Aubert et Vullin, 1997). Ce qui permet de distinguer d'une part, en amélioration des agrumes, des objectifs liés à l'amélioration des porte-greffes et d'autre part ceux liés à l'amélioration des variétés.

I.2.2. Amélioration des porte-greffes

Pour les porte-greffes l'objectif général de sélection consiste en l'obtention de génotypes résistants aux contraintes biotiques et abiotiques. De plus, le porte greffe doit être compatible avec la variété et favoriser le développement d'arbres capable de produire de grandes quantités de fruits de bonne qualité et sur plusieurs années (Khan et Kender, 2007). Les objectifs essentiels de sélection des porte-greffes varient d'une région à une autre en fonction des contraintes rencontrées. En général, l'adaptation aux différents types de sol et aux pathogènes qui s'y trouvent est le premier objectif qui guide les sélectionneurs.

Suivant le type de sol, on recherche une tolérance au sel, une adaptation aux sols alcalins ou acides, mais surtout une résistance ou une tolérance aux *Phytophthora sp.* et aux nématodes. Ainsi, le bigaradier (*Citrus aurantium* L.) a été le porte-greffe phare dans le monde entier, car il est un des rares à tolérer, dans une certaine mesure, la salinité, les pH

élevés, ou les sols calcaires (Grosser *et al.*, 2004). Toutefois, les arbres greffés sur bigaradier sont plus vulnérables aux maladies causées par certaines souches de virus de la Tristeza des agrumes (Rao *et al.*, 2008). La plupart des pays producteurs s'orientent vers la reconversion de leur verger en utilisant des porte-greffes tolérants à cette maladie. Il apparaît toutefois que la plupart des porte-greffes tolérants à la Tristeza sont mal adaptés à beaucoup d'autres contraintes. La création de nouveaux porte-greffes cumulant des tolérances aux contraintes biotiques (Tristeza, *Phytophthora sp.*, nématodes) et abiotiques (calcaire, salinité), tout en conférant un niveau de qualité élevé aux fruits, constitue ainsi un objectif majeur. En effet, au-delà d'un effet quantitatif sur la récolte, le porte-greffe a une influence non négligeable sur le plan qualitatif (calibre, épaisseur de la peau, teneur en jus ou saveur du fruit).

L'intégration des outils de la biotechnologie dans les programmes de sélection a permis de dépasser les limites de l'amélioration traditionnelle. L'hybridation somatique (par fusion de protoplastes) représente ainsi une alternative pour la création de nouveaux porte-greffes, en permettant de cumuler différentes résistances au sein d'un même plant. En effet, la fusion de ces protoplastes permet l'addition de deux génomes avec la possibilité de cumuler les gènes de résistance quelque soit le niveau d'hétérozygotie des géniteurs (Mourao Filho *et al.*, 2008; Ollitrault *et al.*, 2007a). Cette stratégie a notamment permis de créer un hybride intergénérique entre *Poncirus trifoliata* et le mandarinier Commun (*Citrus reticulata* Blanco) qui s'est révélé posséder une résistance à la Tristeza mais aussi un comportement favorable vis à vis des sols calcaires (Ollitrault *et al.*, 2000a). De plus, l'élévation du niveau de ploïdie engendre une plus grande tolérance aux stress hydrique et salin (Saleh *et al.*, 2008).

I.2.3. Amélioration des variétés

Dans le cadre de l'amélioration des variétés, différentes stratégies sont développées afin de répondre aux attentes des consommateurs qui sont de plus en plus exigeants. En effet, pour le marché du fruit frais, la qualité des fruits est un critère essentiel. La définition de la qualité organoleptique peut varier en fonction des zones géographiques. En Occident, elle est déterminée par la coloration, l'arôme, la teneur en jus et le rapport sucre/acidité. Des différences d'appréciation notables existent toutefois entre les différents pays européens. Le sélectionneur doit donc s'efforcer de développer une gamme variétale susceptible de répondre à la diversité de ces perceptions de la qualité organoleptique. L'étalement de la production, le comportement des fruits après récolte constituent également des objectifs très importants des programmes de sélection. Des variétés tardives sont ainsi particulièrement attendues par le marché.

L'aspermie est un caractère majeur du marché des fruits frais et pourrait revêtir une importance pour l'industrie du jus. En effet, la présence de graines dans les fruits pourrait être associée à la présence des composés aromatiques défavorables et de l'amertume (Ollitrault *et al.*, 2007b). Plusieurs stratégies ont été développées pour la création de variétés sans pépins:

- La sélection de variété auto-incompatible. L'auto-incompatibilité pollinique, représente l'impossibilité pour le pollen de féconder la plante dont il est issu. Ce phénomène d'inhibition est de nature biochimique. Chez les agrumes, l'auto-incompatibilité est de type gamétophytique, c'est le génotype du pollen qui détermine ou non le rejet de la germination pollinique. Ce système est exploité pour l'obtention de fruits sans pépin avec des variétés hybrides cultivées en blocs monoclonaux. L'exemple type est le clémentinier qui est la variété d'agrumes auto-incompatible la plus largement cultivée au monde.

- La sélection de mutants stériles permet également de répondre au critère d'aspermie. De nombreux programmes ont été conduits afin de rendre stérile des variétés à pépins mais très intéressantes au niveau organoleptique. On notera actuellement la mise sur le marché des variétés "Mor" et "Tango" issus respectivement des programmes d'irradiation de Murcott et Affourer.

Au-delà de l'aspermie des nouvelles variétés, il convient de sélectionner des cultivars incapables de polliniser les variétés auto-incompatibles. C'est particulièrement important vis-à-vis du clémentinier, qui représente actuellement l'essentiel des vergers de production de petits agrumes dans le Bassin Méditerranéen. A défaut, les vergers de production de clémentinier côtoyant ces nouvelles variétés produiront en effet des fruits contenant de nombreux pépins.

La sélection de cultivars triploïdes, connus pour présenter un fort niveau de stérilité, a été développée pour augmenter le nombre de cultivars aspermes. Dans ce cadre, trois méthodes principales permettant la genèse d'agrumes triploïdes ont été développées :

- La recherche de triploïdes spontanés dans les croisements sexués entre diverses variétés diploïdes ($2x \times 2x$) (Ollitrault *et al.*, 2002). De nombreux hybrides de mandariniers, tangors (mandarinier \times orange) et tangelos (mandarinier \times pomelo) triploïdes ont pu être obtenus après hybridation contrôlée, sauvetage d'embryons et sélection par cytométrie en flux (Frost et Soost, 1968; Navarro *et al.*, 2003). L'IVIA a réussi à mettre sur le marché un certain nombre d'hybrides issus de croisement entre le mandarinier Fortune et différentes autres variétés (Murcott, Ellendale, ...).

- L'hybridation sexuée entre variétés diploïdes et tétraploïdes ($2x \times 4x$) (Navarro *et al.*, 2003). Les parents tétraploïdes sont créés par hybridation somatique ou sont sélectionnés dans des semis nucellaires. Une hybridation entre la clémentine Montréal ($2x$) et l'orange Tarocco ($4x$) a donné naissance au triploïde Tacle à présent protégé et disponible sur le marché (Starrantino, 1999).

- L'hybridation somatique entre génotypes haploïdes et cultivars diploïdes ($1x + 2x$). Les génotypes haploïdes sont obtenus par gynogenèse induite. Cette technique consiste à féconder une plante avec du pollen irradié puis à sauver l'embryon par culture *in vitro* (Froelicher *et al.*, 2007; Ollitrault *et al.*, 2000c). Les protoplastes haploïdes sont fusionnés à des protoplastes diploïdes. Cette méthode, permet donc de créer directement par fusion de protoplastes, des hybrides triploïdes en conservant l'intégralité de la constitution génétique de cultivars diploïdes présélectionnés (Kobayashi *et al.*, 1997; Ollitrault *et al.*, 2000c).

I.3. L'HYBRIDATION SOMATIQUE CHEZ LES AGRUMES

I.3.1. Principe de l'hybridation somatique

L'hybridation somatique consiste en une fusion de cellules non reproductrices dépourvues de leurs parois pectocellulosiques après une digestion enzymatique. Ces cellules, appelées protoplastes, peuvent provenir soit de cals soit de feuilles. Pour les agrumes, cette fusion se fait, entre protoplastes originaires de différents cals, ou alors entre protoplastes de cal et protoplastes de feuille. En effet, seuls les protoplastes issus de cals possèdent la propriété de totipotence qui va permettre la régénération d'une plantule, contrairement aux protoplastes issus du mésophylle.

Deux techniques de fusion de protoplastes ont été développées, une chimique et l'autre électrique.

I.3.1.1. La fusion chimique

Chez les agrumes, la fusion chimique au PEG est la première à avoir été utilisée pour l'hybridation somatique (Ohgawara *et al.*, 1985) et elle a permis l'obtention de nombreux hybrides (Grosser *et al.*, 2000). Il s'agit toutefois, d'une méthode lourde, parfois peu reproductible, qui exige une grande pratique pour arriver à avoir de bons résultats (Olivares-Fuster *et al.*, 2005).

I.3.1.2. L'électrofusion

Lors d'une fusion électrique, les protoplastes sont soumis à un champ électrique alternatif de faible intensité (15 s, 125 V/cm) induisant un alignement des cellules (chapelets de protoplastes). La fusion est induite par de courtes impulsions de courant continu de forte intensité (30 μ s, 1250 V/cm), répétée 5 fois à intervalle de 0,5 s. Ce traitement se traduit par une désorganisation temporaire des membranes qui permet ainsi un échange du matériel génétique. La fusion électrique de protoplastes est la technique la plus facilement reproductible et elle a été utilisée avec succès chez les agrumes (Hidaka et Omura, 1992; Ollitrault *et al.*, 1996b; Guo et Deng, 1998).

Les deux méthodes de fusion peuvent être combinées avec succès, on parle de fusion électrochimique. La méthode consiste en une agrégation des protoplastes à l'aide d'une faible concentration de PEG, suivie par une ou plusieurs impulsions électriques (Olivares-Fuster *et al.*, 2005).

I.3.2. Les produits de la fusion de protoplastes

Les hybrides somatiques issus de fusions de protoplastes sont de trois types (Figure 4), des hybrides allotétraploïdes, des hybrides aneuploïdes et des cybrides diploïdes.

I.3.2.1. Les hybrides somatiques allotétraploïdes

Les hybrides somatiques allotétraploïdes sont caractérisés par un niveau de ploïdie tétraploïde, suite à la fusion des deux génomes nucléaires parentaux. Au niveau génome cytoplasmique, ils peuvent arborer soit les organites d'un des parents, soit différentes combinaisons des organites parentaux allant jusqu'à la présence de recombinaisons dans les mitochondries (Figure 4a).

I.3.2.2. Les hybrides asymétriques aneuploïdes

Les aneuploïdes contiennent le génome nucléaire d'un des parents avec quelques chromosomes ou fragments d'ADN issus du second parent (Figure 4b). Au niveau cytoplasmique, ils contiennent soit les organites d'un des parents, soit une combinaison des génomes cytoplasmiques parentaux.

I.3.2.3. Les cybrides

Les cybrides sont caractérisés par leur diploïdie. Le génome nucléaire de l'un des parents est soit associé avec la totalité du génome cytoplasmique de l'autre parent, ou alors associé avec une combinaison des génomes cytoplasmiques des deux parents (Figure 4c).

I.3.3. Caractérisation des hybrides somatiques

Le produit d'une fusion somatique est ainsi constitué d'autofusions, d'hétérofusions, de multifusions de protoplastes et de protoplastes parentaux non fusionnés (Ollitrault *et al.*, 2000d; Ollitrault *et al.*, 2007a). La régénération des plantules étant faite sans marqueur de sélection, il est nécessaire de pouvoir identifier les hybrides parmi toutes les plantules. L'utilisation des marqueurs moléculaires ou biochimiques combinée avec les techniques d'évaluation de la ploïdie (cytométrie en flux) a montré une grande efficacité (Grosser *et al.*, 1992; Ollitrault *et al.*, 2000a).

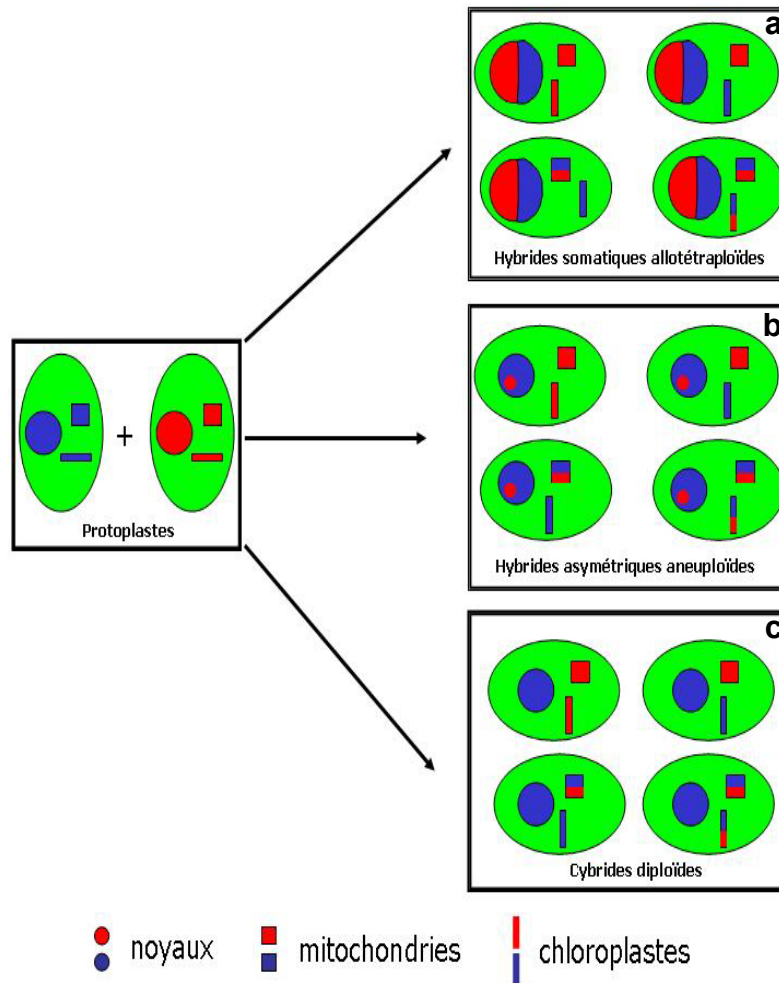


Figure 4: Produits de la fusion de protoplastes d'après Ollitrault *et al.*, (2000).

I.3.3.1. Caractérisation du génome nucléaire

Plusieurs techniques d'analyse du polymorphisme de l'ADN sont utilisées pour étudier la diversité génétique chez les agrumes et caractériser l'origine génétique des hybrides tels que les marqueurs biochimiques et moléculaires.

L'utilisation des isozymes constitue un outil simple et performant pour la caractérisation des hybrides (Ollitrault *et al.*, 1996b). Ces marqueurs biochimiques correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Ils révèlent le polymorphisme des séquences de certaines protéines et de façon indirecte, le polymorphisme des séquences d'ADN à partir desquelles elles sont traduites.

La "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), qui se base sur la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction pour révéler du polymorphisme, est l'une des

premières techniques moléculaires utilisée pour l'identification des hybrides somatiques (Miranda *et al.*, 1997; Ohgawara *et al.*, 1985).

La "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) repose sur l'amplification de sites aléatoires du génome sur lesquels s'hybrident des amorces très courtes de séquence définie arbitrairement. Cette technique permet aussi l'identification d'hybrides somatiques (Guo *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1997), mais elle est peu reproductible (Grosser *et al.*, 2000) et l'interprétation génétique des profils peut être problématique. Elle peut être particulièrement utile lorsque les marqueurs co-dominants tel que les isozymes et la RFLP ne montrent pas de polymorphismes entre les parents (Ollitrault *et al.*, 2007a). Les ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) et les marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) sont également des marqueurs dominants qui permettent, l'identification des hybrides somatiques. Aujourd'hui, les marqueurs les plus performants pour l'identification des hybrides somatiques sont les STMS (Sequence-Tagged MicroSatellites) ou SSR (Single Sequence Repeats). Ce sont des marqueurs codominants et particulièrement polymorphes dans le groupe des mandariniers (Froelicher *et al.*, 2008; Luro *et al.*, 2001).

I.3.3.2. Caractérisation du génome cytoplasmique

Le génome cytoplasmique est représenté par l'ADN chloroplastique et l'ADN mitochondrial. Différents types de marqueurs sont utilisés chez les agrumes pour la caractérisation des génomes cytoplasmiques : la RFLP, les microsatellites et les CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) et les marqueurs PCR.

Chez les agrumes l'analyse du génome cytoplasmique est généralement faite à l'aide des marqueurs RFLP (Cabasson *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2000a; Moreira *et al.*, 2000b; Ollitrault *et al.*, 1996b). Cette méthode est très efficace, mais difficilement applicable aux plantules *in vitro*. En effet, elle nécessite l'utilisation de quantités relativement importantes de matériel végétal (Ollitrault *et al.*, 2007a). Les méthodes PCR sont donc nécessaires pour l'analyse précoce des organelles chez les hybrides somatiques.

La méthode CAPS est une méthode combinant l'amplification par des amorces universelles chloroplastiques ou mitochondriales et la restriction avec des endonucléases (RFLP). Elle a été développée pour la caractérisation cytoplasmique des hybrides somatiques aux niveaux intragénérique (*Citrus*) et intergénérique (dans la sous-famille des *Aurantioideae*). Ces marqueurs se sont révélés efficaces pour l'étude des génomes chloroplastiques et mitochondriaux d'hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques (Lotfy *et al.*, 2003b). Cette méthode est plus simple, rapide et moins coûteuse que la méthode

RFLP, et elle est applicable à des vitroplants. En revanche, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence du polymorphisme mitochondrial dans le genre *Citrus*.

Basé sur les propriétés de conformation de l'ADN, la Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) a été développée avec succès afin d'analyser le contenu cytoplasmique des hybrides somatiques (Olivares-Fuster *et al.*, 2007).

Tout comme pour le génome nucléaire, des marqueurs microsatellites chloroplastiques (Cheng *et al.*, 2005; Lotfy *et al.*, 2003a) ont été développés ces dernières années. En revanche, aucun marqueur de type microsatellite mitochondrial n'est actuellement disponible chez les agrumes. Des marqueurs PCR mitochondriaux ont récemment été développés avec succès et permettent d'observer du polymorphisme intragénérique (Froelicher *et al.*, Submitted).

I.3.4. Intérêt et implications de l'hybridation somatique pour l'amélioration des agrumes

L'hybridation somatique permet l'accroissement de la diversité des pools géniques des espèces cultivées. En effet, elle donne la possibilité de réaliser des hybridations intra et interspécifiques mais aussi intergénériques sans être confrontée aux incompatibilités rencontrées lors des hybridations sexuées (génomes sexuellement incompatibles). Elle permet aussi de conserver la totalité des génomes sans qu'il y ait de méiose, et de pouvoir cumuler des gènes d'intérêts dans une nouvelle plante. Ces constructions sont particulièrement intéressantes dans le cadre de l'amélioration des porte-greffes. Pour les variétés, l'hybridation somatique facilite la manipulation de la ploïdie dans le but d'obtenir des hybrides triploïdes aspermes.

I.3.4.1. La création de cybrides

La création de cybrides consiste en l'obtention d'hybrides somatiques diploïdes associant le noyau d'un parent avec le génome cytoplasmique d'un autre parent, ou alors un génome cytoplasmique issu de la combinaison des organites des deux parents.

Les cybrides sont généralement obtenus par une fusion de protoplaste dite asymétrique. C'est une fusion entre, d'une part, des protoplastes irradiés pour détruire leurs noyaux, et d'autre part, des protoplastes dont les mitochondries et chloroplastes ont été inactivés par des traitements à l'iodoacétate (Galun *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1993; Vardi *et al.*, 1987). Toutefois, il faut noter que la plupart des cybrides obtenus chez les agrumes proviennent de l'hybridation somatique conventionnelle, dite symétrique (Grosser *et al.*, 2000). Xu *et al.* (2006) ont

récemment développé chez les agrumes, une technique de production de cytoplastes, afin d'optimiser l'obtention de cybrides.

La création de cybrides a pour objectif principal de profiter des caractères d'intérêt agronomique liés à certains génomes cytoplasmiques. La stérilité mâle et certaines tolérances déterminées au niveau cytoplasmique constituent les principaux objectifs qui y sont associés (Barsby *et al.*, 1987; Pelletier *et al.*, 1982; Thomzik et Hain, 1988; Varotto *et al.*, 2001). La stérilité mâle cytoplasmique est l'un des principaux caractères d'intérêt ciblé par la cybridisation, pour l'obtention de variétés aspermes. Elle est présente chez le mandarinier Satsuma et probablement chez l'oranger Navel. Beaucoup d'efforts sont fournis pour pouvoir transférer cette stérilité à différentes variétés d'intérêt commercial. Des cybrides combinant le cytoplasme du mandarinier Satsuma à des noyaux de pamplemoussier et différents petits agrumes ont été créés en Floride (Guo *et al.*, 2004). Leur fructification prochaine permettra de déterminer si oui ou non, l'interaction noyau-mitochondrie favorise l'aspermie de ces génotypes.

I.3.4.2. La création directe d'hybrides triploïdes

L'hybridation somatique a permis la synthèse directe d'hybrides triploïdes par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes en conservant l'intégralité de la constitution génétique de cultivars diploïdes présélectionnés (Ollitrault *et al.*, 2000c).

Cette stratégie de synthèse de triploïdes développée par le CIRAD-FLHOR, a pour objectif d'orienter le phénotype des hybrides triploïdes à partir de la sélection faite sur les variétés diploïdes dont le génome est transmis intégralement. Elle est particulièrement intéressante pour valoriser les cultivars diploïdes traditionnels adaptés aux conditions et aux attentes qualitatives des marchés locaux mais qui contiennent généralement de très nombreux pépins (Ollitrault *et al.*, 2008). La première étape consiste à la production de lignées haploïdes soit par gynogenèse induite à l'aide de pollen irradié sur des variétés monoembryonnées (Froelicher *et al.*, 2007; Ollitrault *et al.*, 1996a), soit par androgenèse sur des génotypes polyembryonnés et monoembryonnés (Germana, 1992). Les fusions entre des protoplastes haploïdes de clémentiniers obtenus par gynogenèse induite (Germana, 1992) et des protoplastes d'une dizaine de cultivars diploïdes ont produits les premières plantes hybrides triploïdes. Cependant, cette méthode est actuellement limitée par le faible potentiel des haplométhodes chez les agrumes et donc par la très faible diversité du compartiment haploïde.

I.3.4.3. La création d'hybrides allotétraploïdes

La création d'hybrides somatiques allotétraploïdes a été développée dans un premier temps, pour la création de porte-greffes combinant différents gènes de résistances. En effet, face aux contraintes biotiques et abiotiques de plus en plus défavorables aux porte-greffes existants, il a fallu explorer une nouvelle voie de création de porte-greffes. D'intéressants caractères de tolérance à ces stress biotiques et abiotiques sont présents chez les différentes espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés. Leur exploitation a été limitée par la biologie de la reproduction des agrumes et la forte hétérozygotie de la plupart des cultivars et porte-greffes. En revanche, l'hybridation somatique permet le cumul des caractères de tolérance aux stress abiotiques et de résistance à des pathogènes tels que la Tristeza et le *Phytophthora* au sein d'un même génotype (Ollitrault *et al.*, 2000a).

La création d'hybrides somatiques allotétraploïdes a également été utilisée afin d'élargir le pool des géniteurs tétraploïdes utilisés pour l'obtention de triploïdes aspermes dans les croisements entre variétés diploïdes et tétraploïdes (Ollitrault *et al.*, 2000d). Plusieurs dizaines de combinaisons d'hybrides allotétraploïdes ont été obtenus de part le monde (Grosser *et al.*, 2000). Les premières floraisons de certains d'entre eux ont permis d'aborder la seconde phase de cette stratégie en pollinisant des variétés diploïdes afin de générer des populations triploïdes.

La polyploïdisation par hybridation somatique a permis de combiner la totalité des génomes nucléaires de différents génotypes sans aucune limitation. Au-delà de l'élargissement du pool tétraploïde du complexe d'espèce, les hybrides obtenus représentent un outil original pour l'analyse des règles de l'hérédité des caractères phénotypiques chez les agrumes.

I.4. DE NOUVELLES QUESTIONS DE RECHERCHES SUR LES DETERMINANTS DE LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE

Le recours à l'hybridation somatique conduit à générer des génotypes originaux tant par leur structure nucléaire que par les nouvelles associations entre génomes nucléaires et cytoplasmiques. Il soulève ainsi de nouvelles questions de recherches sur l'expression des caractères phénotypiques chez les allotétraploïdes d'agrumes et sur les interactions nucléo-cytoplasmiques. Au niveau international, des évaluations sont en cours pour plusieurs hybrides interspécifiques et intergénériques dans le but de comprendre les mécanismes qui régissent la transmission des caractères phénotypiques et l'hérédité au niveau des génomes allopolyploïdes d'agrumes. De même quelques études se sont intéressées aux modifications phénotypiques chez les cybrides d'agrumes. Compte tenu des ressources biologiques disponibles, les agrumes constituent ainsi l'un des rares modèles de ligneux pérennes pour aborder ce type d'étude.

I.4.1. Les interactions nucléo-cytoplasmiques

Chez les eucaryotes, l'information génétique est répartie entre le génome nucléaire et le génome cytoplasmique représenté par les organelles (Atienza *et al.*, 2007). Les interactions entre ces génomes régissent le développement des plantes supérieures (Zubko *et al.*, 2001). Plusieurs effets liés à l'interaction nucléo-cytoplasmique ont été décrits chez différentes espèces, comme la tolérance à la sécheresse chez *Brassica carinata* (Uprety et Tomar, 1993), la résistance aux pathogènes chez le blé de la variété Penjamo (Voluevich et Bulovich, 1992), l'effet positif sur la production d'amidon chez *Solanum tuberosum* (Lossi *et al.*, 2000), la tolérance à une carence en fer chez *Triticum aestivum* (Zhang *et al.*, 2003). Les différentes études montrent que ce sont des incompatibilités nucléo-cytoplasmiques apparaissant suite à une alloplasmie (cybrides), à des réarrangements et/ou mutations cytoplasmiques, qui seraient à l'origine de ces phénotypes particuliers (Allen, 2005; Bogdanova, 2007; Hanson, 1991). Les interactions nucléo-cytoplasmiques, restent toutefois peu connues chez les plantes supérieures (Atienza *et al.*, 2007; Babiychuk *et al.*, 1995; Hanson, 1991).

I.4.1.1. Les interactions noyau-mitochondrie

Le plus important caractère lié à l'incompatibilité nucléo-cytoplasmique est probablement la stérilité mâle cytoplasmique (CMS), qui a été largement décrite dans les programmes

d'amélioration chez de nombreuses espèces (Atienza *et al.*, 2007). Comme son nom l'indique, la CMS est un caractère généralement hérité de façon maternelle, lié au cytoplasme, et est déterminé par des gènes mitochondriaux. Ces gènes ont de nouveaux cadres de lecture ouverts, ORF, qui résultent de réarrangements complexes de l'ADN mitochondrial, et sont généralement à l'état de gènes chimériques. Ils sont souvent composés d'une mosaïque de séquences de gènes mitochondriaux classiques et de séquences d'origine inconnue (Pelletier et Budar, 2007). Ces ORF sont généralement co-transcrits avec les gènes mitochondriaux, mais aucune homologie entre les différentes séquences des polypeptides codés par ces ORF n'a été retrouvée et leur fonction reste inconnue (Leino *et al.*, 2003).

La CMS affecte les organes reproducteurs mâles provoquant des dysfonctionnements comme le développement anormal de certains organes floraux, l'absence d'étamines, la production de pollen non viable (Pelletier et Budar, 2007). Ainsi, plusieurs chercheurs ont observé une conversion des étamines en une structure carpellaire semblable à celle observée chez les mutants d'*A. thaliana*, "*Apetala3*" et "*Pistillata*" (Bowman *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 1991), notamment pour des lignées CMS de colza (Leino *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2005a), de tabac (Farbos *et al.*, 2001; Kofer *et al.*, 1991; Zubko *et al.*, 1996), de carotte (Linke *et al.*, 2003) et de blé (Murai *et al.*, 2002). Outre les modifications spécifiques à la fleur, d'autres aberrations ont été associées à la CMS comme une réduction du développement végétatif (Leino *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 1999) et une diminution de la production d'ATP (Bergman *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005b).

La modification du génome mitochondrial peut aussi se traduire par la formation de mutants respiratoires qui se manifeste par des phénotypes embryonnaires létaux ou alors par des plants chlorosés, qui généralement ne survivent pas (Newton *et al.*, 2004). Chez le maïs, les mutants nommés "non chromosomal stripe", sont caractérisés par des phénotypes variables comme le ralentissement de la croissance, des anomalies morphologiques, des feuilles à rayures. Ces mutants présentent une délétion spécifique au niveau de l'ADN mitochondrial (Newton et Coe, 1986). Des modifications similaires ont également été observées chez un cybride de *Nicotiana tabacum* et *Petunia hybrida* (Bonnett *et al.*, 1993) et aussi chez un mutant d'*A. thaliana* (Sakamoto *et al.*, 1996). Ces altérations au niveau de l'ADN mitochondrial provoquent une modification de l'expression de certains gènes nucléaires ce qui contribue à la modification du phénotype (Carlsson *et al.*, 2008). En effet, les études moléculaires sur les mutations et les modifications du génome mitochondrial ont montré que l'expression de certains gènes nucléaires comme ceux codant pour des oxydases secondaires et des protéines de réponse aux chocs thermiques étaient affectés (Rhoads et Subbaiah, 2007).

Ce phénomène de régulation de l'expression des gènes nucléaires par le génome mitochondrial a été appelé "retrograde signalling" (Butow et Avadhani, 2004; Liu et Butow, 2006; Rhoads et Subbaiah, 2007). Le mécanisme a été très largement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où il est utilisé comme un détecteur du dysfonctionnement mitochondrial afin d'initier des réajustements du métabolisme des sucres et de l'azote (Butow et Avadhani, 2004).

Les effets des gènes mitochondriaux peuvent être corrigés par l'action de gènes nucléaires restaurateurs de la fertilité mâle (gènes Rf). En effet, les gènes déterminant la CMS sont présents chez différents organismes, mais ils restent masqués par les gènes Rf correspondants présent au niveau nucléaire. Ainsi, l'expression de la CMS reste masquée jusqu'à ce que les allèles restaurant la fertilité soient perdus suite à des modifications génétiques, lors de croisements inter-spécifiques, d'hybridations somatiques et de transgénèses, qui créent une nouvelle combinaison nucléo-mitochondriale (Chase, 2007; Sandhu *et al.*, 2007). Les gènes Rf régulent l'expression des gènes déterminants la CMS au niveau post-transcriptionnel (Pelletier et Budar, 2007). Chez plusieurs espèces de plantes telles que *Pétunia*, *Brassica* et *Oryza*, les gènes Rf codent pour des protéines pentatricopeptides répétées, qui sont supposées être des protéines "RNA binding" impliquées dans les processus post-transcriptionnels au niveau des mitochondries (Chase, 2007; Hanson et Bentolila, 2004). Ainsi la combinaison CMS-gènes Rf constitue un bon système de régulation du mode de reproduction. Il a été largement mis à profit dans la production de semences hybrides F1 chez le chou, la carotte, l'oignon, le radis, le colza, le riz, le sorgho, la betterave à sucre, le tournesol et le tabac.

1.4.1.2. Les interactions noyau-chloroplaste

Les chloroplastes ont conservé leur propre génome, appelé plastome, au cours de l'évolution, mais la grande majorité de leurs protéines (80 - 90%) sont codés par des gènes nucléaires (Pesaresi *et al.*, 2007; Venema *et al.*, 2000). Les chloroplastes sont donc des organites semi-autonomes dont le fonctionnement et l'expression des gènes est le résultat d'une interaction complexe entre le génome nucléaire et le plastome (Stern *et al.*, 1997; Taylor, 1989). Comme pour la mitochondrie, un mécanisme de contrôle "rétrograde" permet au chloroplaste de moduler le contrôle de gènes d'origine nucléaire, en fonction des besoins cellulaires (Pesaresi *et al.*, 2007).

Les interactions noyau-chloroplaste ont été étudiées chez des hybrides inter-spécifiques et des cybrides de différentes espèces. Ces études ont montré que le génome chloroplastique

d'une espèce peut être fonctionnellement incompatible avec le génome nucléaire de certaines espèces (Zubko *et al.*, 2002). L'incompatibilité entre le génome nucléaire et le plastome chez ces hybrides empêche la différenciation complète des chloroplastes, qui se traduit par une déficience en chlorophylle, virescence ou panachure (Stubbe et Steiner, 1999; Yao et Cohen, 2000; Zubko *et al.*, 2001). Les premiers exemples d'incompatibilité nucléo-chloroplastique ont été observés chez les hybrides sexués inter-spécifiques d'*Oenothera*. En effet, dans ce groupe on distingue 3 types de génomes nucléaires (A-B-C) de base ainsi que 5 plastomes (I-V) (Dietrich *et al.*, 1997; Raven *et al.*, 1979; Stubbe et Raven, 1979). Des déficiences chlorophylliennes, des inactivations partielles du pollen, peuvent être observées chez les hybrides présentant les différentes combinaisons génome nucléaire-plastome (Stubbe et Steiner, 1999; Zubko *et al.*, 2001). En effet, dans des combinaisons de génome nucléaire-plastome compatibles, comme celle entre le génome nucléaire AA et le plastome IV, les feuilles ont une coloration verte. Par contre dans des combinaisons avec une incompatibilité, les feuilles peuvent être albinos ou vert pâle (Yao et Cohen, 2000). L'incompatibilité de la combinaison B-IV se manifeste par la formation de grains de pollen dont la plupart sont inaptes à germer (Stubbe et Steiner, 1999). Les incompatibilités génome nucléaire-plastome ont également été observés dans des croisements inter-spécifiques, chez *Trifolium* (Pandey *et al.*, 1987; Przywara *et al.*, 1989), *Pelargonium* (Metzlaff *et al.*, 1982; Pohlheim, 1986), *Impatiens* (Arisumi, 1985) et *Zantedeschia* (Yao *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1995).

Chez les cybrides, l'un des premiers exemples d'incompatibilité nucléo-chloroplastique a été observé après la régénération d'hybrides déficients en chlorophylle, combinant un génome nucléaire de *Solanum tuberosum* avec un plastome de *Solanum brevidence* (Perl *et al.*, 1991). De même, chez des cybrides combinant le noyau d'*Atropa belladonna* et le plastome de *Nicotiana tabacum* il a été observé une absence totale de chlorophylle. Bien que, chez ces cybrides, le plastome de *Nicotiana tabacum* soit génétiquement intact, son activité photosynthétique a été inactivé par la présence du génome d'*Atropa belladonna* (Kushnir *et al.*, 1991). Dans de nombreux cas, le transfert de plastomes, même entre espèces très éloignées, donne des cybrides avec une coloration verte normale (Babiychuk *et al.*, 1995; Glimelius et Bonnett, 1986; Kushnir *et al.*, 1987). C'est le cas de cybrides possédant le génome nucléaire du tabac et différents plastomes, dont *Petunia* (Glimelius et Bonnett, 1986), *Atropa* (Kushnir *et al.*, 1987), *Salpiglossis* (Thanh *et al.*, 1988). Toutefois, les écarts dans la composition et le fonctionnement de leur appareil photosynthétique (Babiychuk *et al.*, 1995; Kushnir *et al.*, 1987; Peter *et al.*, 1999), suggèrent l'existence de faibles incompatibilités nucléo-chloroplastiques.

Le changement de chloroplaste peut également affecter de manière modérée les caractères phénotypiques et morphologiques, le rendement et la croissance (Venema *et al.*, 2000). C'est le cas des cybrides entre *Nicotiana tabacum* et *Hyoscyamus niger*. Zubko *et al.* (2001), ont observé que l'absence de pigmentation et le retard dans la croissance sont des caractéristiques permanentes de tous les cybrides ayant hérités l'ADN chloroplastique de *H. niger*. Toutefois, le retard de croissance des cybrides est susceptible d'être un effet secondaire causé par la faible capacité photosynthétique (Zubko *et al.*, 2001). Dans certaines combinaisons, des cybrides n'ont pu être générés en raison de graves incompatibilités noyau-cytoplasme (Kushnir *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 1991; Wolters *et al.*, 1993). Des combinaisons létales de génome nucléaire et plastome entre espèces éloignées ont également été observées chez *Oenothera* (Stubbe et Steiner, 1999) et chez *Zantedeschia* (Yao et Cohen, 2000).

Les mécanismes génétiques contrôlant l'incompatibilité génome nucléaire-plastome sont encore mal compris, bien que le phénomène soit de plus en plus largement étudié (Yao et Cohen, 2000; Zubko *et al.*, 2002). On suppose que ces mécanismes doivent être importants, car de nombreux gènes nucléaires participent à l'édification de l'appareil photosynthétique (Martin et Herrmann, 1998; Yao et Cohen, 2000). De même, avec la coexistence des modes de régulation "enterograde" et "retrograde", une mutation d'un gène codant pour une protéine chloroplastique peut inhiber l'expression de plusieurs autres gènes tant au niveau nucléaire qu'au niveau du plastome (Leon *et al.*, 1998). Bien que, plusieurs gènes jouant un important rôle dans la différenciation des chloroplastes aient été clonés, leurs rôles dans les interactions plastome-génome nucléaire reste encore indéterminés (Yao et Cohen, 2000).

I.4.1.3. L'expression phénotypique chez les cybrides d'agrumes

Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur l'implication des interactions nucléo-cytoplasmiques sur le comportement agronomique et la biosynthèse des composés impliqués dans la qualité des agrumes. En effet, pour les critères d'aspermie, on en est encore au stade de production de cybrides combinant la mitochondrie de la mandarine satsuma, identifiée comme CMS par Yamamoto *et al.* (1997), à différentes variétés intéressantes (Cai *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2004). Ces cybrides devraient entrer bientôt en fructification, ce qui va permettre de déterminer si les nouvelles interactions nucléo-mitochondriales permettent l'obtention de cultivars aspermes sans altérer la qualité organoleptique des fruits (Ollitrault *et al.*, 2007a).

Au niveau agronomique, les premières observations suggèrent que la cybridisation peut entraîner une variabilité favorable. Tusa *et al.* (2000) ont évalué la résistance de cybrides entre l'oranger Valencia et le citronnier Femminello au "mal secco". La faible mortalité

observée chez les cybrides après inoculation, suggère que des mécanismes spécifiques de tolérance au "mal secco" pouvaient être activés chez ces nouveaux génotypes (Tusa *et al.*, 2000). L'évaluation de cybrides d'orangers et de mandariniers au CREC (Grosser *et al.*, 2000) a mis en évidence des variations pour des caractères importants comme la date de maturité et le nombre de pépins. Enfin, Fanciullino *et al.* (2005) ont étudié les effets de l'interaction nucléo-cytoplasmique sur la composition des huiles essentielles de la feuille. Ils ont pu déterminer des différences quantitatives dans la composition totale de certains composés aromatiques des feuilles des cybrides avec une augmentation de 4 à 21 %. Deux cybrides entre le mandarinier et le kumquat ont été étudiés, l'un possédant le noyau du kumquat et les organites (chloroplastiques et mitochondriaux) du mandarinier et l'autre le noyau et les chloroplastes du kumquat avec les mitochondries du mandarinier. Seul le premier cybride, avec le cytoplasme complet du mandarinier, a synthétisé plus de monoterpènes, de sesquiterpènes hydrocarbonés et d'alcools sesquiterpéniques comparé au parent kumquat. Fanciullino *et al.* (2005) en ont conclu que cette surproduction était liée à l'interaction noyau kumquat-chloroplaste mandarinier.

I.4.2. Allopolyploïdie et expression génomique et phénotypique

La polyploïdie est reconnue comme une composante majeure dans l'évolution des eucaryotes particulièrement chez les angiospermes (Soltis et Soltis, 1993; Soltis *et al.*, 2004). De nombreuses espèces cultivées aujourd'hui à l'état diploïde sont en fait ce qu'on appelle des paléopolyploïdes, donc d'anciens polyploïdes (Chen, 2007). Ces espèces dériveraient d'un processus de duplication complète de leur génome, suivi de pertes massives de gènes et de réorganisations génétiques appelé phénomène de diploïdisation (Wolfe, 2001). Des plantes comme *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Zea mays* représentent les parfaits exemples de paléopolyploïdes (Blanc *et al.*, 2003; Gaut, 2001; Vision *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005). On estime que 30 à 70 % des espèces végétales sont d'origine polyploïde (Masterson, 1994; Wolfe, 2001). La polyploïdisation pourrait être le plus commun des mécanismes de spéciation sympatrique (Otto et Whitton, 2000).

Les allopolyploïdes sont des individus polyploïdes ayant un génome résultant de la combinaison de deux à plusieurs génomes différents. Cette polyploïdisation pouvant se réaliser de façon naturelle ou artificielle, par la fusion somatique (cf Figure 4a). Dans le cas d'une allopolyploïdisation naturelle, différents mécanismes peuvent intervenir lors des croisements sexuels. En effet, il peut y avoir un doublement du lot chromosomique après un

croisement interspécifique (Figure 5a), une fécondation entre un ovule et un gamète male tous deux non réduits (Figure 5b) et enfin un croisement entre deux autotétraploïdes (Figure 5c).

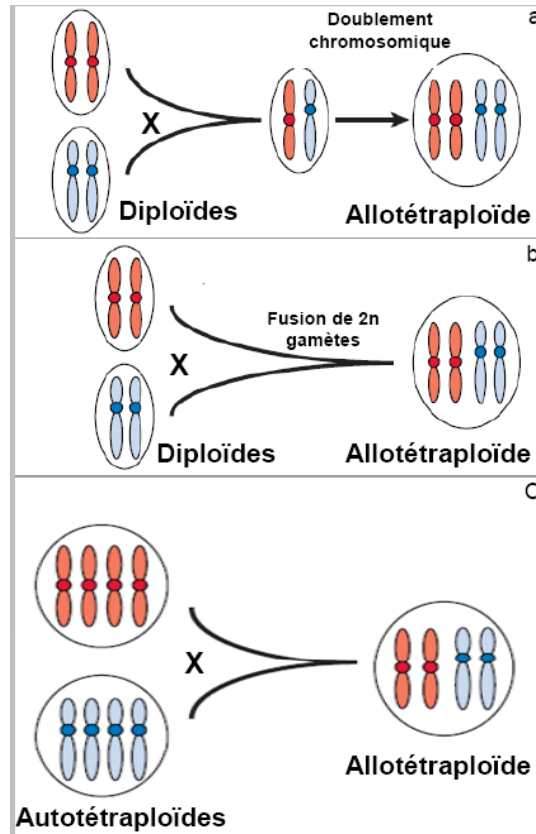


Figure 5: Phénomènes d’allopolyploïdisation naturels d’après Chen (2007)

I.4.2.1. L’identification des plantes polyploïdes

Les études à l’aide des marqueurs moléculaires, la GISH (hybridation génomique *in situ*) et la cartographie génétique, ont permis l’identification de nouvelles espèces polyploïdes, mais aussi d’identifier l’origine de leurs génomes, notamment grâce à l’analyse des séquences des ADN ribosomiques et chloroplastiques. Ces techniques à la différence des autres (basé sur les caractères biochimiques et morphologiques) sont indépendantes de l’expression génétique et donc insensibles aux variations environnementales (Leitch et Bennett, 1997). Ces analyses moléculaires ont permis de démontrer que plusieurs espèces jusqu’alors considérées comme diploïdes étaient en fait des polyploïdes. Moore *et al.* (1995) ont pu ainsi montrer que le maïs était en fait une plante tétraploïde constituée de deux génomes bien distincts. Dans certains cas, ces études moléculaires ont permis de revenir à la

hausse le niveau de ploïdie de certaines espèces polyploïdes comme le coton. Ce dernier, depuis toujours, considéré comme allotétraploïde se révèle être un paléo-octoploïde formé il y a 1,1 à 1,9 millions d'années. Ces paléopolyploïdes subissent dans le temps des pertes massives de gènes et des réorganisations génétiques portant le nom typique de phénomènes de diploïdisation (Wolfe, 2001).

Ces observations montrent que la polyploïdie a joué un rôle prépondérant dans l'évolution des génomes des plantes supérieures (Soltis et Soltis, 1993; Soltis *et al.*, 2004). En effet, il apparaît aujourd'hui que la plupart des plantes à fleurs et peut être même tous les eucaryotes possèdent des génomes avec beaucoup de gènes redondants, ce qui serait le résultat des phénomènes de polyploïdisation (Soltis *et al.*, 2004). Des études récentes sur diverses espèces polyploïdes ont apporté des informations sur la manière dont les génomes polyploïdes évoluent après leur formation, sachant que la plupart des polyploïdes sont très anciens et leurs géniteurs exacts méconnus (Chen, 2007; Gaeta *et al.*, 2007). Les travaux sur des polyploïdes synthétiques ont permis de voir que des changements génétiques et épigénétiques très importants survenaient, parfois très rapidement, suite à la polyploïdisation (Chen et Pikaard, 1997; Comai *et al.*, 2000; Leitch et Bennett, 1997). En plus, la polyploïdisation permet l'apparition de phénotypes intermédiaires aux parents mais aussi de phénotypes tout à fait nouveaux suggérant une expression non additive des gènes. Les techniques moléculaires de plus en plus appropriées (analyses microarray, méthylation-sensitive AFLP (MSAP), cDNA-SSCP...) permettent de mettre un peu plus en évidence les mécanismes intervenant dans l'expression génomique et phénotypique chez les polyploïdes.

I.4.2.2. Les modifications génétiques liées à la polyploïdisation

Les modifications génétiques peuvent apparaître très rapidement après la polyploïdisation. Ils peuvent se traduire par des réarrangements et transpositions chromosomiques ainsi que des éliminations de séquences génomiques spécifiques (Feldman *et al.*, 1997; Salmon *et al.*, 2005; Shaked *et al.*, 2001; Tate *et al.*, 2006; Ungerer *et al.*, 1998). Le marquage chromosomique (GISH, FISH) a permis de mettre en évidence un nombre important de réarrangements chromosomiques chez des allopolyploïdes de *Nicotiana tabacum*, *Avena maroccana* (Leitch et Bennett, 1997; Soltis et Soltis, 1999; Wendel, 2000). De même, les données obtenues par marquage chromosomique à l'aide de BAC montrent que le caryotype *Arabidopsis* $n = 5$, proviendrait d'un ancêtre à $n = 8$ par une série de translocations et d'inversions chromosomiques (Lysak *et al.*, 2003). Toutefois, des observations récentes suggèrent que les réarrangements chromosomiques ne seraient pas une

règle générale chez les polyploïdes. En effet, certains polyploïdes, notamment le coton, ne montrent pas de réarrangement (Hegarty et Hiscock, 2008; Liu *et al.*, 2001).

I.4.2.3. Les modifications épigénétiques liées à la polyploïdisation

Il est aujourd'hui démontré que les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones, dominance nucléolaire, éléments transposables ...), jouent un rôle non négligeable dans l'expression génétique des génomes polyploïdes (Chen et Pikaard, 1997; Comai, 2000; Osborn *et al.*, 2003).

La régulation épigénétique de l'expression des gènes chez les organismes polyploïdes par le biais de méthylation des cytosines a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (Hegarty et Hiscock, 2008). Les études sur des allopolyploïdes synthétiques d'*A. suecica* ont mis en évidence des "silencing" d'origine épigénétique qui portent sur 2,5 % des gènes (Lee et Chen, 2001). La plupart de ces modifications a été associée à des altérations de la méthylation des cytosines sur des sites spécifiques, ainsi qu'à des altérations de la structure de la chromatine (Comai *et al.*, 2000; Madlung *et al.*, 2002). Chez *Spartina* l'hybridation interspécifique entre *S. alterniflora* et *S. maritima* conduit à une modification de 30% des profils de méthylation parentaux (Salmon *et al.*, 2005). Il apparaît que le reformatage épigénétique n'est pas aléatoire puisque des événements indépendants d'hybridation conduisent à des similarités fortes des régions affectées par la méthylation du génome (Adams *et al.*, 2004; Salmon *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2004b).

Une autre constatation faite chez les polyploïdes néo-synthétisés, est que l'hybridation pourrait se traduire par l'activation généralisée des éléments transposables en raison de l'instabilité du nouveau génome. Nous pouvons citer en exemple l'étude de Madlung *et al.* (2005), utilisant des "microarray" d'*Arabidopsis* couvrant une région hétérochromatiques du chromosome 4 qui contient de multiples transposons. Ils ont montré que certains transposons montrent une activation chez l'allopolyploïde comparé aux parents (Madlung *et al.*, 2005). L'activation de transposons a également été observée chez des allopolyploïdes synthétiques du blé. L'activation de certains éléments transposables s'accompagne d'une régulation négative des gènes situés en aval de leurs nouvelles positions (Kashkush *et al.*, 2003).

L'expression des gènes dupliqués par la polyploïdie peut être variable dans différentes parties de la plante, ce qui indique une régulation différentielle des gènes homoéologues au cours du développement de la plante. Ce processus, connu sous le nom de "subfunctionalisation", a été proposée comme un mécanisme pouvant permettre aux gènes dupliqués d'être maintenus dans les génomes polyploïdes (Kellogg, 2003; Otto et Whitton,

2000). Chez le cotonnier, un comportement similaire a été observé pour certains gènes aussi bien sur des hybrides allotétraploïdes synthétiques et sur les cotonniers allotétraploïdes naturels dont l'origine remonte à plus d'1 million d'années. Ainsi, par exemple, pour le gène *adhA* (alcool déshydrogénase A), ce sont les allèles du génome A qui sont exprimés dans les carpelles (ceux du génome D étant réprimés) alors que l'inverse est observé dans les étamines et les pétales (Adams *et al.*, 2003). Cette 'subfonctionnalisation' des gènes dupliqués est un aspect important de la polyploïdisation. Elle conférerait aux polyploïdes un avantage adaptatif immédiat. Elle expliquerait par ailleurs leur conservation dans une proportion relativement élevée. En effet il est généralement admis qu'à partir du moment où un gène est dupliqué, il va, soit évoluer vers une nouvelle fonction, soit être supprimé par délétion ou formation d'un pseudogène (Ohno, 1970). La fréquence des gènes dupliqués conservés apparaît toutefois beaucoup plus élevée que la probabilité pour ces mêmes gènes d'avoir acquis une nouvelle fonction avant d'être perdus. Rapp et Wendel (Rapp et Wendel, 2005) proposent que la "subfonctionnalisation" préserverait les gènes dupliqués et les garderait ainsi disponibles pour l'acquisition de nouvelles fonctions à long terme.

1.4.2.4. Expression génomique et phénotypique chez les hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes

L'hybridation somatique permet de combiner l'ensemble des génomes nucléaires de deux génotypes quelle que soit leur degré d'hétérozygotie et sans qu'il y ait de méioses. C'est donc un outil original pour comprendre les règles de transmission des caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes synthétiques. Chez les agrumes, des évaluations sont en cours pour plusieurs hybrides interspécifiques et intergénériques, dans le but de comprendre les mécanismes gouvernants cette hérédité au niveau des génomes allopolyploïdes d'agrumes (Grosser *et al.*, 2004; Grosser *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2004 ; Guo et Grosser, 2004; Ollitrault *et al.*, 2000d). Les premières évaluations agronomiques suggèrent que les hybrides somatiques sont généralement plus vigoureux que les diploïdes doublés. En revanche, certaines caractéristiques des hybrides somatiques semblent liées à la tétraploïdie *per se*. Ainsi, les hybrides somatiques allotétraploïdes et les autotétraploïdes utilisés comme porte-greffe confèrent généralement une croissance réduite de la variété, comparés à leurs parents diploïdes (Grosser *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1990). De même, des travaux réalisés en Floride montrent une amélioration de la tolérance aux nématodes chez les hybrides somatiques et les diploïdes doublés par rapport aux parents diploïdes. Les résultats récemment obtenus par le CIRAD (Mouhaya *et al.*, Submitted; Saleh *et al.*, 2008) sur la tolérance aux

stress hydrique et salin suggèrent que l'état tétraploïde confère une meilleure tolérance. Il faut aussi signaler que l'immunité à la Tristeza du Poncirus est transmise de manière dominante chez ses hybrides somatiques (Ollitrault *et al.*, 2000a). Il semble en être de même pour la tolérance aux *phytophthora* sp. (Grosser *et al.*, 2000).

Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur la transmission des déterminants de la qualité chez les hybrides somatiques d'agrumes. La majorité de ces travaux a été réalisée sur les composés aromatiques des feuilles (Alonzo *et al.*, 2000; Fatta del Bosco *et al.*, 1998; Gancel *et al.*, 2002; Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005a; Gancel *et al.*, 2005b; Gancel *et al.*, 2006) et des polyphénols de la pulpe des fruits (Tusa *et al.*, 2007). Les résultats témoignent d'une variabilité assez importante dans le profil des hybrides comparé à celui de leurs parents. Les auteurs concluent généralement que l'hybridation somatique n'entraîne pas à une simple addition des différents caractères parentaux (Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005b; Tusa *et al.*, 2007). Gancel *et al.* (2005b) mentionnent ainsi une diminution généralisée de la biosynthèse de sesquiterpénoïdes dans les feuilles de 13 hybrides somatiques, interspécifiques et intergénériques, comparés à leurs parents. Des phénomènes de dominance ont pu être observés pour certains hybrides, tandis que pour d'autres aucune dominance n'a pu être établie. Ainsi, Gancel *et al.* (2003, 2005a) ont montré que les hybrides somatiques combinant le génome du mandarinier Willow leaf avec ceux de la lime, des citronniers Eureka et lac, de l'orange douce, de pomelo, de kumquat, de poncirus, exhibent un profil de composés aromatiques de feuille plus proche du mandarinier. La dominance du mandarinier a été également confirmée au niveau de l'expression du protéome (Gancel *et al.*, 2006). En revanche, sur une autre étude portant sur les huiles essentielles de six hybrides somatiques, résultants de combinaisons entre le limetier, le citronnier, le cédratier, l'oranger et le pomelo, aucune dominance n'a été clairement observée contrairement aux résultats observés avec la mandarine (Gancel *et al.*, 2005a). Les travaux portant sur l'expression du protéome par électrophorèse bidimensionnelle, ont également montrés des modifications très importantes chez un hybride somatique interspécifique, mandarine + lime (*C. deliciosa* + *C. aurantifolia*), et sur un hybride somatique intergénérique, mandarine + kumquat (*C. deliciosa* + *Fortunella margarita*). La modification de l'expression des gènes chez les deux hybrides somatiques par rapport à leurs parents est globalement très forte. Les analyses mettent à jour des phénomènes de "silencing" sur de nombreux spots, affectant plus particulièrement ceux des parents lime et kumquat. Ainsi, près de 75% des spots spécifiques de ces parents sont éteints chez les hybrides. Ils ont noté également l'apparition de nombreux nouveaux spots,

14% pour l'hybride mandarine + lime et 29% pour l'hybride mandarine + kumquat, dont 5 communs aux deux hybrides (Gancel *et al.*, 2006).

Lors de leur étude portant sur les polyphénols de la pulpe des fruits, Tusa *et al.* (2007) ont observé que le profil métabolique de l'hybride somatique entre l'oranger Valencia et le citronnier Femminello occupe une position intermédiaire à celle des parents, avec une légère dominance du génome du citronnier. En revanche, cet hybride somatique présente un profil d'acides hydroxycinnamiques proche de l'oranger Valencia.

I.5. LES DETERMINANTS DE LA QUALITE DU FRUIT

Pour le marché du fruit frais, la qualité des fruits est un critère essentiel pour le consommateur. Cette qualité s'exprime tout d'abord au niveau visuel (coloration des fruits, calibre, épaisseur de la peau...), puis au niveau gustatif (saveurs, flaveur, arômes...). Ainsi, les caroténoïdes, intervenant dans la coloration des fruits, le rapport sucre/acidité, essentiel pour le goût et enfin les huiles essentielles, responsables des arômes, représentent les plus importants indicateurs de la qualité organoleptique des fruits. La teneur de ces composés est variable d'une variété à une autre et selon le stade de développement du fruit.

I.5.1. Les sucres et les acides organiques

I.5.1.1. Généralité sur les sucres et acides organiques de la pulpe des agrumes

Les sucres et les acides sont les principaux déterminants du goût des fruits. Ainsi, le rapport sucre/acidité est généralement utilisé pour la détermination du stade optimal de récolte de la plupart des fruits d'agrumes (Loussert, 1989).

La teneur en sucre dans la pulpe des agrumes est assurée principalement par trois sucres : le saccharose, le glucose et le fructose. Les agrumes peuvent être divisés en deux groupes, celui des fruits acides (cédrats, citrons et limes) et celui des fruits moins acides ou doux (oranges, mandarines, pomelos, ...) (Ollitrault *et al.*, 2003). Chez les fruits doux, l'accumulation des sucres augmente de façon très marquée durant la phase de maturation du fruit (Baldwin, 1993) en même temps que diminue l'accumulation des acides organiques (Cercos *et al.*, 2006; Rasmussen, 1964; Richardson *et al.*, 1997). Par contre chez les limes et les citrons, l'acidité augmente rapidement pendant le développement du fruit pour atteindre des valeurs maximales puis reste assez constante à la maturité du fruit (Albertini *et al.*, 2006; Cercos *et al.*, 2006; Rasmussen, 1964; Sinclair, 1984), tandis que les sucres restent à un niveau assez bas. Les teneurs de chacun de ces trois sucres varient d'une variété à l'autre. Dans les jus de fruits de l'orange et de la mandarine, le saccharose est le sucre majoritaire (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996) à l'opposé du citron et de la lime.

Chez les agrumes, l'acidité du fruit est liée à l'acide citrique qui représente l'acide organique majoritaire à maturité. Il représente entre 60 à 90 % des acides organiques en fonction des variétés (Sinclair, 1984). La clémentine montre à maturité les teneurs en acide citrique les plus faibles tandis que le citron présente les plus fortes (Cercos *et al.*, 2006; Karadeniz, 2004). Le second acide organique majoritaire à maturité est l'acide malique. Il est

présent à des teneurs comprises entre 1,4 et 1,8 mg/ml chez les oranges, et jusqu'à 4,3 mg/ml chez les citrons (Erickson, 1968). D'autres acides du cycle de Krebs sont présents dans la pulpe des fruits d'agrumes, mais en faible concentration comparé aux acides malique et citrique. Nous pouvons citer, les acides tartrique, quinique, ascorbique, oxalique et succinique. Les fruits d'agrumes représentent une importante source d'acide ascorbique pour la nutrition humaine, leurs jus pouvant en contenir entre 40 et 70 mg/ 100ml.

I.5.1.2. Métabolisme des sucres et des acides organiques

Le métabolisme des sucres débute par la formation du saccharose. Le saccharose est produit dans les cellules du mésophylle des "organes sources" et exporté vers le phloème pour être transporté jusqu'aux organes non photosynthétiques, "organes puits", comme les fruits (Taiz et Zeiger, 1998). Dans le cytoplasme des cellules des sacs à jus, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose via l'action des invertases (invertase acide et alcaline) ou de la saccharose synthase (Figure 6). L'activité enzymatique de l'invertase acide (vacuolaire) diminue au cours du développement du fruit favorisant l'accumulation du saccharose, excepté chez le citronnier. Le glucose et le fructose sont phosphorylés par une hexokinase pour former du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate va servir de substrat aux phosphofructokinases (ATP et PPi dépendantes) pour former le fructose-1, 6-biphosphate. Ce dernier sera converti en glyceraldehyde-3-phosphate puis en phosphoenolpyruvate et enfin en pyruvate.

Au niveau du cytoplasme, le saccharose peut également être resynthétisé à partir du glucose et du fructose via la saccharose phosphate synthase, la saccharose phosphatase ou la saccharose synthase (Kubo *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 1997).

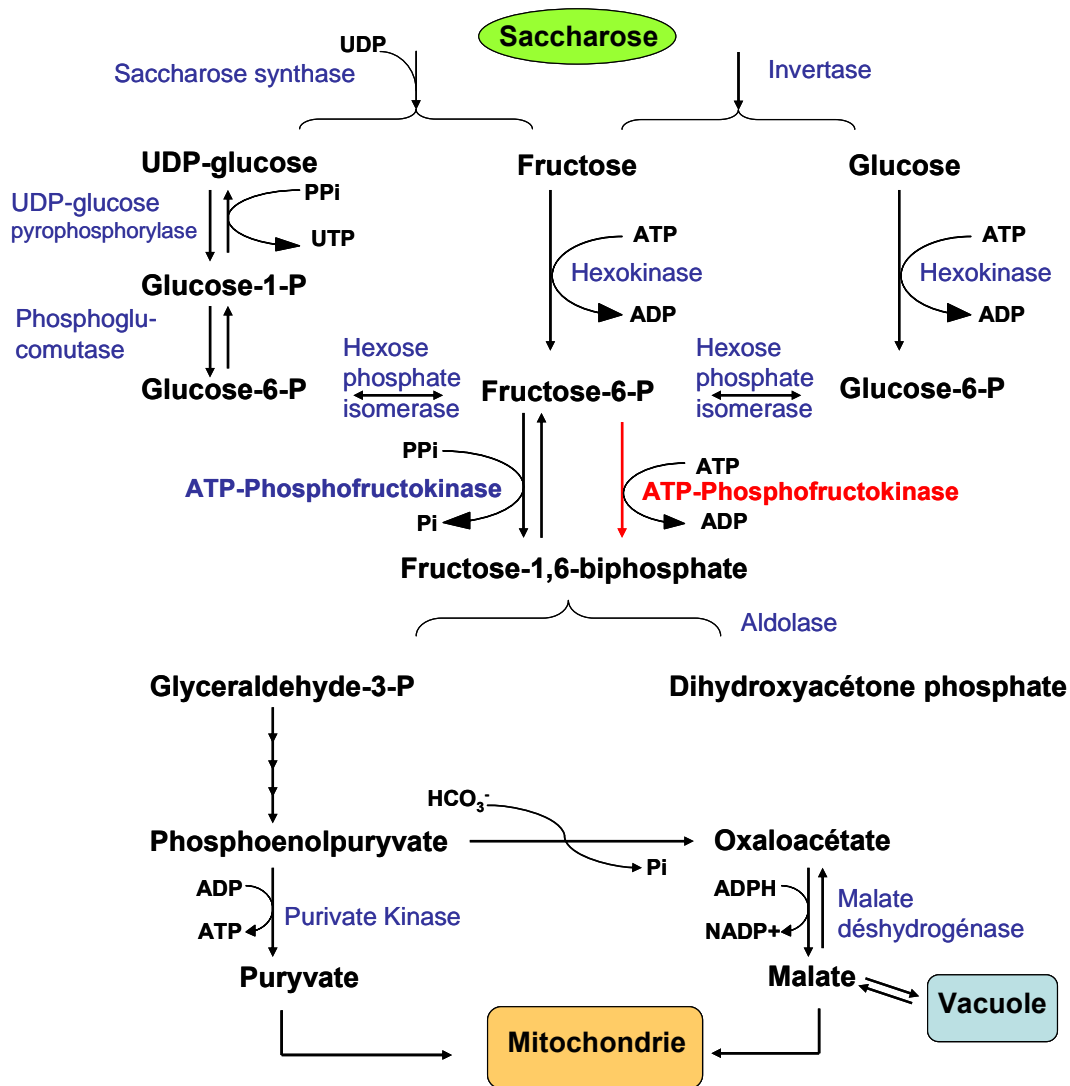


Figure 6: Représentation schématique du métabolisme des sucres (Albertini, 2007)

Le pyruvate et le phosphoenolpyruvate vont servir de précurseur à la synthèse des acides organiques. L'acide citrique est synthétisé dans les matrices mitochondriales des cellules à jus à travers le cycle de Krebs (Sinclair, 1984; Tucker, 1993). L'acétyl-CoA, produit à partir du pyruvate via la pyruvate déshydrogénase, va former par condensation avec l'oxaloacétate, du citrate (Figure 7). Cette réaction de condensation est catalysée par la citrate synthase. En fonction de l'activité enzymatique de l'aconitase mitochondriale, le citrate est soit converti dans la mitochondrie en isocitrate ou alors exporté vers le cytoplasme et/ou la vacuole pour y être stocké (Sadka *et al.*, 2000). Dans le cytoplasme, le citrate est transformé en acétyl-CoA et oxaloacétate par action de la citrate lyase, ou alors en isocitrate via l'aconitase cytoplasmique.

L'isocitrate sera transformé successivement en α -cétoglutarate et en glutamate sous les actions respectives de l'isocitrate déshydrogénase et de la glutamate déshydrogénase.

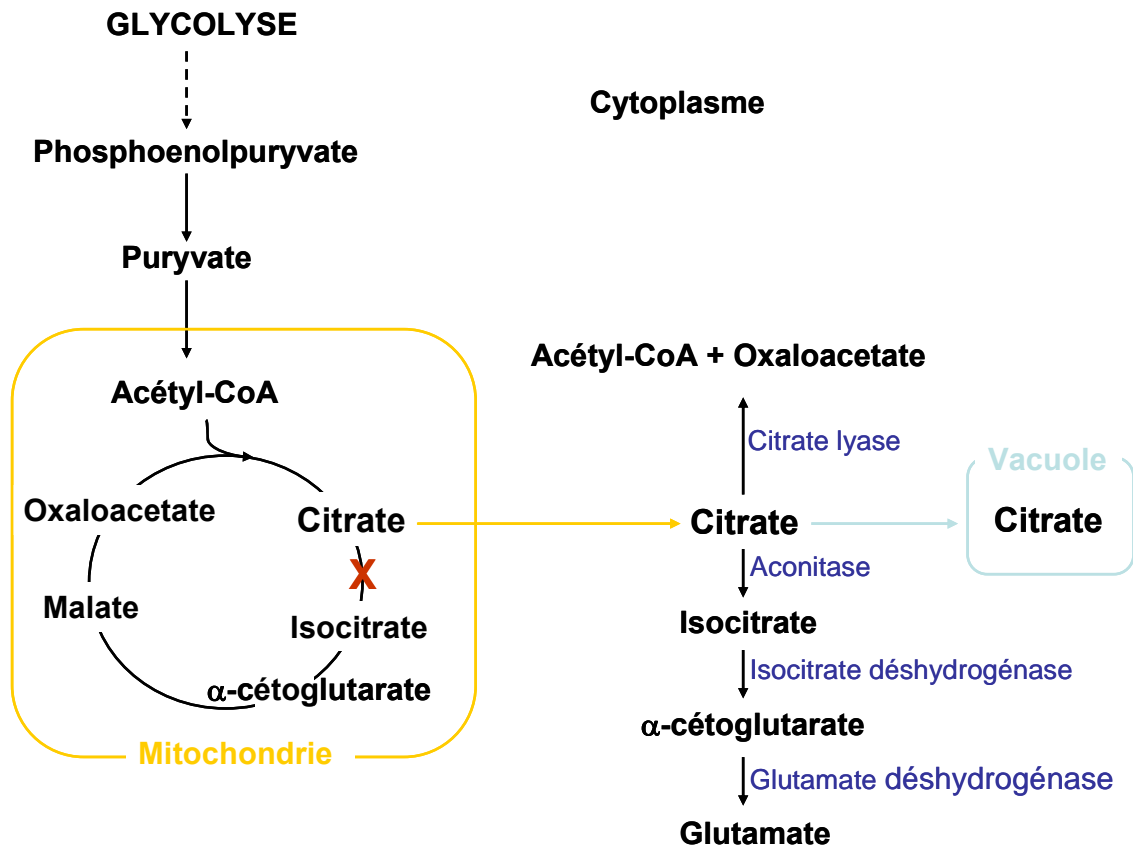


Figure 7: Voie schématique du métabolisme de l'acide citrique dans les cellules des sacs à jus (Albertini, 2007).

L'étude de Cercos *et al.* (2006) sur l'expression globale des gènes durant la maturité du fruit a montré que l'expression du gène de l'aconitase cytoplasmique augmente pendant le développement du fruit, tandis que celle de la citrate lyase diminue. Ils ont pu, grâce à l'analyse de l'expression des gènes codant pour les enzymes cités plus haut, proposer un mécanisme pour expliquer l'utilisation du citrate durant la phase de maturité du fruit (Figure 8). D'après ce mécanisme, la formation de l'acétyl-CoA et oxaloacétate à partir du citrate est minimisée en faveur d'une métabolisation du citrate en glutamate suivie de la conversion du glutamate en glutamine et/ou de son catabolisme à travers la voie du gaba shunt.

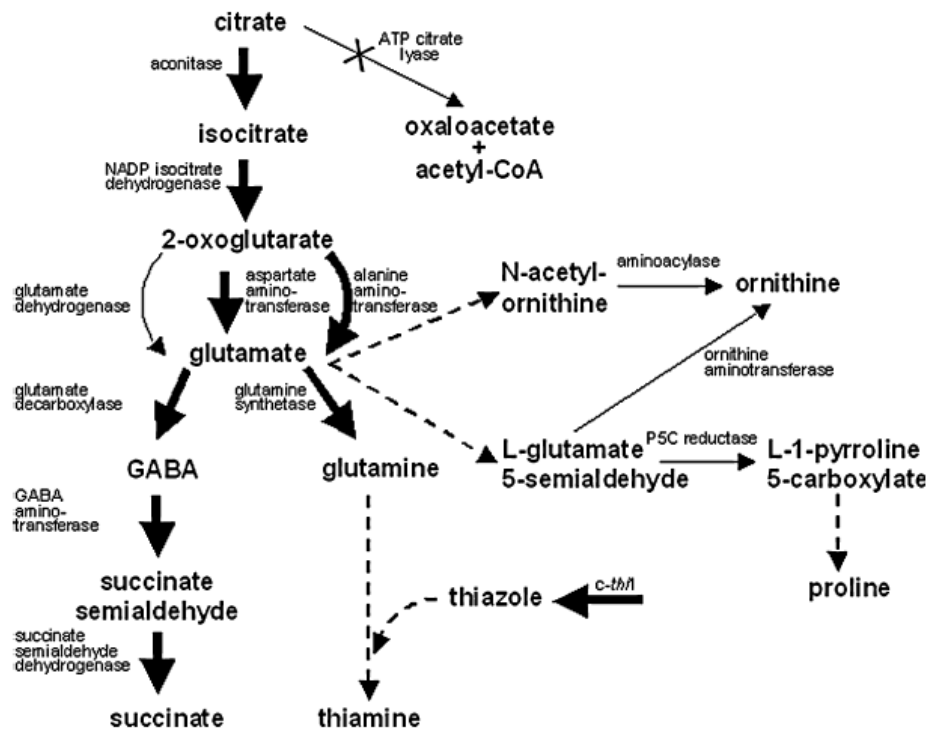


Figure 8: Mécanisme d'utilisation du citrate à la maturité du fruit d'après Cercos *et al.* (2006)

I.5.2. Les caroténoïdes

I.5.2.1. Généralité sur les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles, synthétisés par les plantes et certains microorganismes. Les caroténoïdes sont synthétisés et stockés dans les chloroplastes et plus particulièrement dans les chromoplastes. Les fruits d'agrumes sont très riches en caroténoïdes avec des compositions complexes, plus d'une centaine de molécules isolées chez les agrumes (Gross, 1987). Les caroténoïdes constituent l'une des classes les plus importantes des pigments végétaux avec les chlorophylles, les anthocyanes et les bétalaïnes. En effet, les caroténoïdes et leurs dérivés oxygénés, les xanthophiles, sont responsables de la coloration jaune, orange, rose ou rouge observée au niveau de la pulpe et de la peau des fruits. Nous pouvons citer l'exemple de la β -cryptoxanthine responsable de la couleur orange vif caractéristique de plusieurs fruits d'agrumes.

Au niveau nutritionnel, les caroténoïdes sont des micronutriments d'une importance capitale. Certains d'entre eux, comme le β / α -carotène et la β -cryptoxanthine sont des

provitamines A (Parker, 1996; Vliet *et al.*, 1996). En effet, une molécule de β -carotène peut être divisée en deux molécules de vitamine A. Les caroténoïdes sont aussi des antioxydants (Gardner *et al.*, 2000; Sanchez-Moreno *et al.*, 2003), ce qui leur confère un rôle de choix dans la prévention de certains cancers et des maladies cardiovasculaires (Mayne, 2003; Nishino *et al.*, 1999; Yano, 2002).

I.5.2.2. Métabolisme des caroténoïdes

La synthèse des caroténoïdes a lieu dans les plastes. Les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse sont connus (Cunningham et Gantt, 1998; Fraser et Bramley, 2004; Hirschberg, 2001) et sont d'origine nucléaire. La figure 9 représente les différentes étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. La première étape de cette voie de biosynthèse, catalysée par la phytoène synthétase (PSY), consiste en une condensation de deux molécules de pyrophosphate de géranylgeranyle (GGPP) pour donner le premier caroténoïde de la chaîne, le phytoène. Ensuite, le phytoène est transformé en lycopène par une série de quatre réactions de déshydrogénation catalysées par la phytoène désaturase (PDS), qui convertit le phytoène en phytofluène puis en ζ -carotène et par la ζ -carotène désaturase (ZDS) qui transforme le ζ -carotène en neurosporène puis en lycopène. La cyclisation du lycopène sous l'action de la lycopène ϵ et/ou β cyclase (LCY-e, LCY-b) provoque la division de la voie en deux branches, l'une conduisant à l' α -carotène et l'autre au β -carotène.

L'obtention des deux premiers caroténoïdes oxygénés (xanthophylles) de la chaîne, β -cryptoxanthine et lutéine, est catalysée respectivement par la β -carotène hydroxylase (HY-b) et la ϵ -carotène hydroxylase (HY-e). La zéaxanthine est formée à partir de la β -cryptoxanthine par action de la β -carotène hydroxylase puis transformée en violaxanthine par la zéaxanthine époxydase (ZEP). Demming-Adams *et al.* (1996) ont observé qu'en cas d'éclairement excessif des feuilles, la zéaxanthine pouvait être régénérée à partir de la violaxanthine par deux réactions catalysées par la violaxanthine dé-époxydase (VDE). La dernière étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes consiste en la transformation de la violaxanthine en néoxanthine, réaction catalysée par la néoxanthine synthétase (NSY). Il faut noter que la violaxanthine et la néoxanthine servent de précurseurs pour la synthèse de l'acide abscissique (ABA). L'expression des gènes codant pour la NCED, impliqué dans la formation de l'acide abscissique à partir des xanthophylles, serait corrélée à l'accumulation de l'acide abscissique (Kato *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2006).

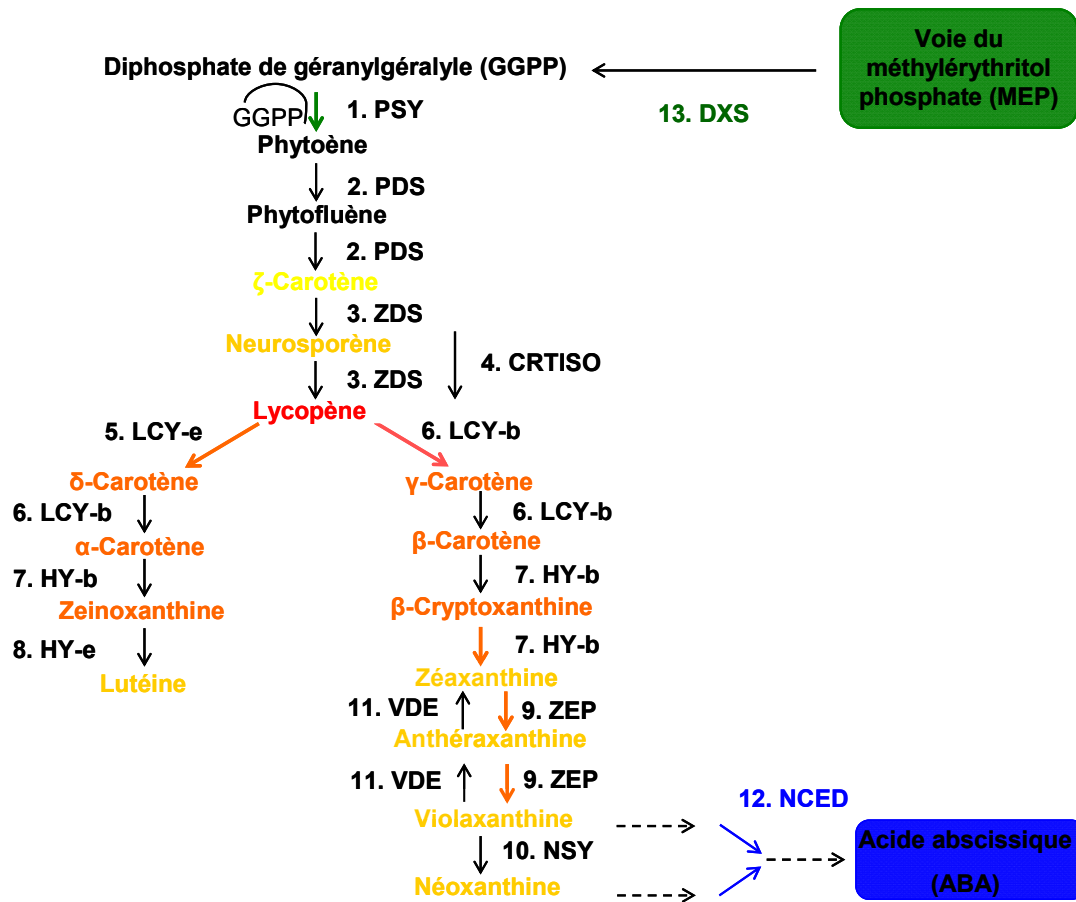


Figure 9: Schéma général de la biosynthèse des caroténoïdes chez les agrumes.

1. PSY, phytoène synthétase; 2. PDS, phytoène désaturase; 3. ZDS, ζ-carotène désaturase; 4. CRTISO, caroténoïde isomérise; 5. LCY-e, lycopène ε-cyclase; 6. LCY-b, lycopène β-cyclase; 7. HY-b, β-carotène hydroxylase; 8. HY-e, ε-carotène hydroxylase; 9. ZEP, zéaxanthine époxydase; 10. NSY, néoxanthine synthétase; 11. VDE, violaxanthine de-époxydase; 12. NCED, 9-cis-époxy hydroxy caroténoïde dioxygénase; 13. DXS, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthétase

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est fortement liée à celle du MEP (méthylérythritol phosphate). En effet, Lois *et al.* (2000) ont montré que l'expression du gène codant pour la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthétase (DXS), première enzyme de la voie du MEP, est corrélée à l'accumulation des caroténoïdes chez la tomate. Les teneurs en β-carotène et lycopène sont respectivement 1,4 à 1,6 fois plus élevées dans les fruits des plants de tomates exprimant en grande quantité un gène bactérien codant pour la DXS.

I.5.3. Les arômes

I.5.3.1. Généralité sur les arômes des fruits des agrumes

Les arômes sont associés dans la perception de la saveur des aliments que nous mangeons. La plupart de ces arômes sont des mélanges complexes de composés volatils dénommés huiles essentielles. Ces huiles sont synthétisées et stockées dans les glandes à huiles essentielles présentes dans l'épicarpe des fruits, les feuilles et les pétales de fleurs d'agrumes.

Les principaux composés d'arômes rencontrés chez les agrumes appartiennent à trois familles :

- les hydrocarbures, quasiment tous de nature terpénique (monoterpènes et sesquiterpènes) et représentent plus de 90% (p/p) des composés d'arômes du zeste
- les alcools et esters
- les composés carbonylés, représentés essentiellement par des aldéhydes

La majorité de ces composés sont présents chez les différentes variétés d'agrumes avec toutefois des variations quantitatives. Ainsi, les huiles essentielles de zeste de mandarines de 15 espèces différentes ont été classées en trois différents "chénotypes" (limonene, limonene/ γ -terpinene et acetate de linalyl /limonene) en fonction des teneurs des composés (Lota *et al.*, 2001). Il faut noter que l'on observe souvent des composés spécifiques à certains génotypes, comme la nootkatone, une cétone-sesquiterpène caractéristique du pomelo ou le *N*-méthylanthranilate de méthyle, un amino-ester caractéristique de la mandarine commune (*Citrus deliciosa*) (Gancel, 2004; Lawrence, 1996).

I.5.3.2. Métabolisme des composés d'arôme

La synthèse des composés d'arômes a lieu au niveau de la chaîne de biosynthèse des terpénoïdes, qui est en partie responsable de la synthèse de nombreux métabolites chez les plantes tels que, les vitamines et caroténoïdes, les tocophérols, les chlorophylles, et les régulateurs de croissance. Deux voies de biosynthèse sont impliquées dans la formation des terpènes. La plus connue est la voie cytoplasmique du mévalonate acceptée durant des décennies comme seule et unique voie de biosynthèse des terpénoïdes (Spurgeon et Porter, 1981).

L'autre voie est celle du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP), aussi appelée voie non-mévalonique; elle se déroule dans les chloroplastes des plantes (Lichtenthaler *et al.*,

1997; Rohmer *et al.*, 1996). Ces deux voies permettent la synthèse des deux bio-précurseurs des terpènes (précurseurs en C5), le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et le pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP). Ce dernier subit une élongation électrophile (Figure 10), grâce à des prényltransférases comme la GPP synthase (GPPS), pour former le pyrophosphate de géranyle (GPP) par addition d'une molécule d'IPP, le pyrophosphate de farnésyle (FPP) par ajout de 2 IPP et enfin le pyrophosphate de géranylgéranyle (GGPP) avec 3 IPP. Les monoterpènes, les alcools et aldéhydes correspondants sont synthétisés à partir du GPP. Les sesquiterpènes et tri-terpènes quant à eux sont synthétisés à partir du FPP (Figure 10). Les di-terpènes (gibbérélines et tocophérols) et tétra-terpènes (caroténoïdes) proviennent du GGPP.

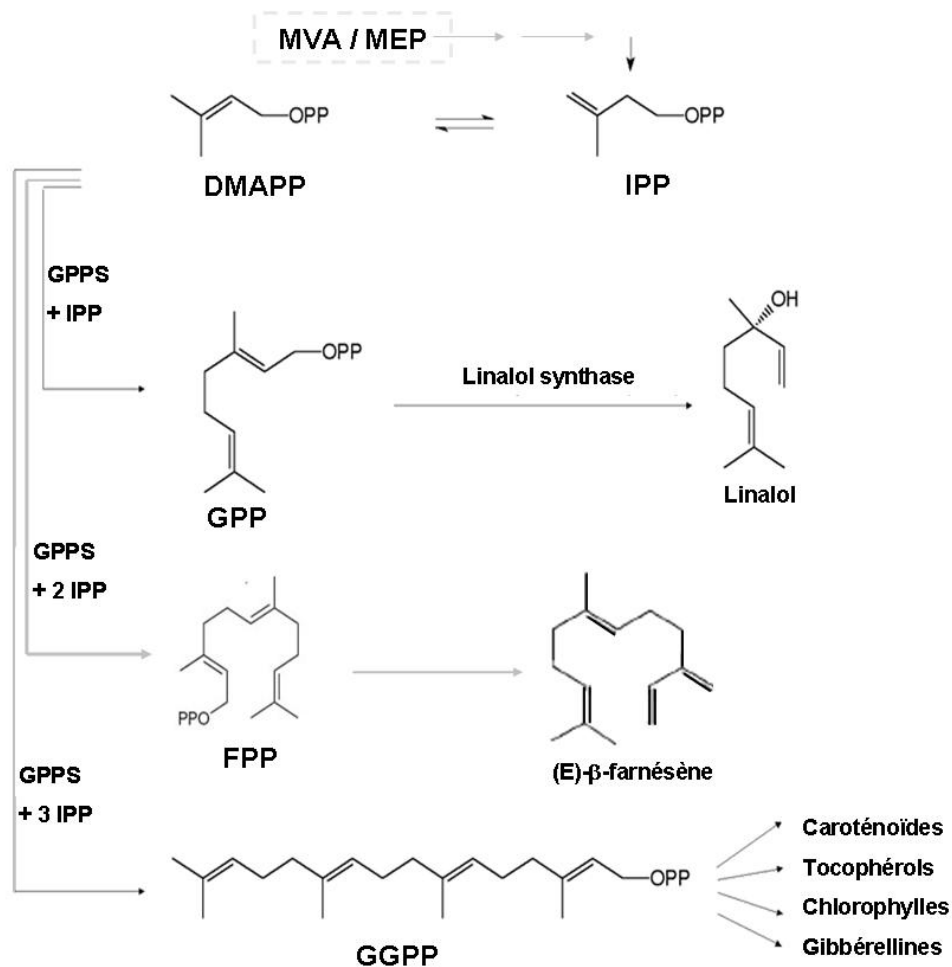


Figure 10: Biosynthèse des terpénoïdes d'après Croteau *et al.* (2000)

I.6. LES OBJECTIFS DE LA THESE

Les nouvelles stratégies d'amélioration des agrumes conduisent à manipuler la ploïdie du complexe d'espèce. Pour les cultivars, l'objectif est d'obtenir des hybrides triploïdes produisant des fruits sans pépin. Pour les porte-greffes, la stratégie est de cumuler des caractères dominants de tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques dans des hybrides somatiques allotétraploïdes. L'hybridation somatique par fusion de protoplastes est ainsi une composante forte de nombreux programmes d'amélioration des agrumes à travers le monde et en particulier de ceux développés par le Cirad en Corse. Cette méthode génère par ailleurs des associations nucléocytoplasmiques originales tant au niveau tétraploïde que diploïde. Un certain nombre d'équipes sont ainsi engagées dans la création de cybrides diploïdes dans l'objectif de modifier ponctuellement certaines caractéristiques des cultivars. Ces stratégies d'amélioration soulèvent ainsi de nouvelles questions de recherches sur l'expression du génome et l'hérédité des caractères chez les hybrides somatiques d'agrumes.

Pour aborder ces questions dans le cadre de cette thèse, nous avons sélectionné deux parents présentant des caractères phénotypiques très contrastés, le mandarinier commun cv 'Willow leaf' et le citronnier cv 'Eureka'. En effet, ces deux génotypes montrent une très grande différence au niveau des caractères liés à la qualité du fruit qui constitue la cible principale de notre étude au niveau phénotypique. La mandarine est un fruit de coloration orange et doux contrairement au citron qui est un fruit de coloration jaune et acide. La constitution aromatique est également très différente. Il existe donc une différenciation importante au niveau des chaînes de biosynthèse des métabolites primaires (sucres, acides) et secondaires (arômes et caroténoïdes en particulier). La différenciation génétique est également importante, le citron est en effet un hybride interspécifique d'origine complexe impliquant trois (*C. medica*, *C. reticulata* et *C. maxima*) des quatre taxons de base des agrumes cultivés. De même, l'origine phylogénétique du cytoplasme est différente. Le mandarinier commun a un cytoplasme provenant du taxon *C. reticulata* et celui du citronnier provient du taxon *C. maxima*. Les travaux ont porté sur un hybride allotétraploïde et un cybride de la combinaison mandarinier + citronnier qui constituent ainsi d'excellents modèles pour analyser les interactions nucléo-cytoplasmiques et l'impact de l'allopolypléidisation.

A partir de ce matériel, nous allons tenter de répondre aux questions suivantes:

- Les génomes cytoplasmiques ont-t-ils un impact sur la régulation de l'expression du génome nucléaire et sur l'expression phénotypique et en particulier sur les caractéristiques déterminant la qualité du fruit.
- Quelle est l'expression phénotypique et génomique chez les hybrides somatiques allotétraploïdes.

Afin de répondre à ces questions, nous avons effectué (i) une description pomologique des parents et des hybrides à l'aide des descripteurs de l'International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) et de l'Union de Protection des Obtentions Végétales (UPOV), dans le but de déterminer l'hérédité des caractères morphologiques dans le cadre de l'hybridation somatique; (ii) des mesures qualitative et quantitative des composés intervenant dans la détermination de la qualité du fruit (les sucres, les acides organiques et les caroténoïdes) par analyse HPLC; (iii) une analyse de l'expression des gènes abordée dans un premier temps de manière globale grâce aux "microarrays", pour avoir un aperçu global des modifications de la régulation de l'expression du génome, puis dans un second temps de manière ciblée, en analysant le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par PCR en temps réel.

Les résultats du présent mémoire sont structurés en 8 chapitres. Le premier traite de la caractérisation génétique et cytogénétique des 2 hybrides somatiques diploïdes et tétraploïdes, les trois suivants abordent l'étude de l'expression phénotypique et transcriptomique chez le cybride tandis que les quatre derniers traitent de ces questions pour l'hybride allotétraploïde. Les 2 chapitres sur l'expression des caractères de la qualité des fruits sont présentés sous forme d'articles publiés dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (JAFC) en 2008 pour le cybride et soumis à JAFC pour l'allotétraploïde. De même les résultats concernant l'expression du transcriptome de l'hybride allotétraploïde sont présentés sous forme d'articles qui seront soumis début 2009 à *Journal of Heredity* (analyse microarray) et *BMC Plant Biology* (étude de l'expression des gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes).

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIEL VEGETAL

Ce travail de thèse porte sur quatre génotypes, à savoir le mandarinier Willow leaf (*Citrus deliciosa* Ten.) et le citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm.), ainsi que leur hybride somatique allotétraploïde [WLM + EUR 4x (*Citrus deliciosa* Ten.) + (*Citrus limon* (L.) Burm.)] et leur cybride diploïde [WLM + EUR 2x (*Citrus deliciosa* Ten.) + (*Citrus limon* (L.) Burm.)] obtenus par hybridation somatique (Ollitrault *et al.*, 2000). Nous précisons que selon Tanaka (1961), le mandarinier cv "Willow leaf" est classé dans *C. deliciosa*, alors que selon Swingle et Reece (1967) il fait partie de *C. reticulata* qui regroupe l'ensemble des mandariniers. Ainsi, dans ce mémoire l'une ou l'autre classification a pu être utilisée.

L'ensemble de ces variétés est greffé sur volkameriana (*Citrus limonia* Obs.) avec 3 répétitions par variétés et planté aléatoirement sur une parcelle homogène de la Station de Recherches Agronomiques Inra/Cirad de San Giuliano (Corse).

II.2. CARACTERISATION GENETIQUE DES HYBRIDES SOMATIQUES

II.2.1. Evaluation de la ploïdie

L'identification du niveau de ploïdie des différents génotypes étudiés dans le cadre de cette thèse est réalisée par cytométrie en flux et par comptage chromosomique.

II.2.1.1. Cytométrie en flux

Un échantillon de feuille est prélevé sur chaque plant afin d'évaluer son niveau de ploïdie à l'aide d'un cytomètre de type Partec PA-I. L'échantillon, additionné d'une portion de feuille d'un témoin interne triploïde, est haché à l'aide d'une lame de rasoir, en présence de 250 µL de tampon d'extraction (Partec, Cystain UV Précise P *Nuclei Extraction Buffer*), afin de libérer les noyaux. La solution obtenue est filtrée à l'aide d'un filtre Partec de 30µm et le filtrat recueilli dans un tube de 10 ml.

A la suspension de noyaux ainsi obtenue sont additionnés 600 µL de tampon de coloration, contenant du DAPI (Partec, Cystain UV Précise P *Staining Buffer*). Ce fluorochrome se fixe spécifiquement à l'ADN. L'intensité de la fluorescence réémise par les noyaux sous excitation UV (365 nm) est proportionnelle à la quantité d'ADN. Les résultats obtenus pour plusieurs milliers de noyaux analysés individuellement lors de leur passage dans

le cytomètre en flux sont retranscrit sur un histogramme. La position, sur l'axe des abscisses, des pics obtenus, est proportionnelle à la quantité d'ADN et donc à la ploïdie.

II.2.1.2. Comptage chromosomique

Le comptage de chromosomes est réalisé à partir de très jeunes feuilles en croissance. Les feuilles récoltées sont traitées avec une solution à 0,04% d'hydroxyquinoline pendant 4 h à température ambiante, puis 4 h à 4°C. Les feuilles sont ensuite fixées pendant 48 h dans un mélange éthanol/acide acétique (3:1) et stockées dans 70% d'éthanol à 4°C. La préparation des lames pour le comptage chromosomique est effectuée tel que décrit par (D'Hont *et al.*, 1996). Les chromosomes sont colorés avec du DAPI. L'observation des chromosomes se fait à l'aide d'un microscope Nikon 80i.

II.2.2. Caractérisation des génomes nucléaires et cytoplasmiques

Les hybrides somatiques ainsi que leurs parents sont étudiés à l'aide de marqueurs moléculaires, afin de déterminer l'origine de leurs génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial.

II.2.2.1. Extraction d'ADN

L'ADN des plants est extrait à partir de 100 mg de feuille selon un protocole modifié, dérivé de la méthode décrite par Doyle et Doyle (Doyle J J, 1987). La portion de feuille est broyée en présence d'azote liquide et d'une pincée de sable de Fontainebleau. Le broyat mélangé à 500µL de tampon d'extraction [2% (p/v) MATAB, 1,4M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH=8, 50mM EDTA, 1% (p/v) PVP, 0.5% Bisulfite de Sodium (p/v)] est transvasé dans un tube eppendorf de 2 mL puis incubé pendant 20 min à 65°C. A température ambiante, 500 µL de chloroforme/alcool iso amylique (24/1 ; v/v) sont rajoutés au tube, puis le mélange est soumis à une agitation douce (agitateur rotatif) pendant 10 min. Après une centrifugation de 5 min à 8000 g, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube eppendorf avec 2,5 x volume d'éthanol 96° froid, afin de précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 5 min à 12000 g, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est séché avant de lui rajouter 50 µl d'eau déminéralisée stérile.

II.2.2.2. Amplification des ADN par PCR

Les ADN sont amplifiés par PCR avec des couples d'amorces nucléaires, mitochondriales et chloroplastiques avec un thermocycler Primus 96 plus MWG Biotech. La composition du mélange PCR est la suivante :

Tableau 1: Composition du mélange PCR

	Concentration finale
Tampon 10X	1 x
MgCl ₂ (25mM)	1,5 mM
dNTP (25mM)	0,2 mM
Amorce R (25µM)	0,4 µM
Amorce F (25µM)	0,4 µM
Taq Polym, (3u/ul)	0,8 u
Eau (mq)	qsp 15 µL
Tampon 10x Eurogentec (5% glycérol, 2mM tris HCl, 10mM KCl, 0,01mM EDTA, 0,1mM DTT, 0,05 Tween 20, 0,05% Nonited P40)	

L'amplification est réalisée sur un volume total de 20 µL contenant 15 µL du mélange PCR et 5 µL d'ADN à 2 ng.µl⁻¹. Le programme d'amplification se compose des cycles suivants : un cycle de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min ; puis 40 cycles d'amplification [dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30s - hybridation des amorces à température variable selon les amorces (50, 55, 60°C) pendant 30s - élongation à 72°C pendant 1 min] ; et enfin une élongation finale à 72°C pendant 4 min.

Après amplification, 20µl de bleu de séquençage (98% formamide (v/v), 0,25% xylène cyanol(p/v), 0,25% bleu de bromophenol (p/v), 10mM EDTA pH8) sont rajoutés à chaque échantillon.

II.2.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les produits PCR sont séparés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 5%, urée 7 M) Ce gel permet de différencier deux fragments d'ADN au nucléotide près.

Le gel est placé dans une cuve contenant du tampon TBE 0.5x (TBE 5x : 54 g Tris base, 27,5 g d'acide borique, 20 mL d'EDTA 0,5 M pH8, eau distillée qsp 1L) pour une pré-migration de 30 min sous une puissance constante de 60W. Les échantillons d'ADN dénaturés (5min à 94°C) sont déposés sur le gel. La migration est relancée dans les mêmes conditions que la pré-migration pour une durée variable en fonction de la taille des fragments attendus.

La révélation des fragments d'ADN se fait par coloration au nitrate d'argent comme décrit par Beidler *et al.* (1982). L'ADN est fixé dans un bain d'alcool à 10 % pendant 20 min puis dans un bain d'acide nitrique 1 % pendant 5 min ; puis le gel est lavé dans deux bains

successifs d'eau ultra pure (18 M Ω) pendant 5 min. Le gel est ensuite plongé dans un bain de nitrate d'argent 0,2% (p/v) durant 30 min ; puis les fragments d'ADN sont révélés par 2 bains successifs avec une solution de carbonate de sodium (NaCO₃ 30g.l⁻¹, formaldéhyde 600 μ l.l⁻¹). La révélation est stoppée par un bain d'acide acétique à 5% pendant 1min ; puis le gel est rincé à l'eau déminéralisée et recouvert d'un film.

II.2.2.4. Marqueurs microsatellites nucléaires

L'ADN des hybrides et de leurs parents est amplifié à l'aide de 26 paires de marqueurs nucléaires (Froelicher *et al.*, 2008). Ces couples d'amorces sont sélectionnés pour leur polymorphisme entre les parents (Tableau 2). Cette analyse permet de caractériser l'origine du génome nucléaire de chaque hybride par comparaison avec les profils des parents respectifs.

Tableau 2: Liste des amorces SSR nucléaires utilisés pour la caractérisation des hybrides

Amorce	Séquence (5' – 3')	Tm	Taille
Ci01C07	F: GTCACCTCACTCTCGCTCTTG R: TTGCTAGCTGCTTTAACTTT	55	241-278
Ci01H05	F: AAAACAACCAAAAGGACAAGATT R: TTCAAACCTAAACAAACCAACTCG	55	99-103
Ci02A04	F: CCGCTTTGTTCCATT R: AGCGGTATCGTAATTCTC	55	160-168
Ci02B07	F: CAGCTCAACATGAAAGG R: TTGGAGAACAGGATGG	50	164-172
Ci06A05b	F: TCTCTGGTTGGTTTTTGTGA R: ATGATGAAAAGCAAGGGG	50	174-228
Ci07B09	F: AAAGTGGAGTGCTAAATCT R: AAAGAAGTTAAAGAAAAAATG	50	191-194
Ci07C07	F: TATCCAGTTTGTAATGAG R: TGATATTTGATTAGTTTGG	50	220-234
Ci07D06	F: CCTTTTCACAGTTTGCTAT R: TCAATTCCTCTAGTGTGTGT	55	187-200
Ci07F11	F: ACTATGATTACTTTGCTTTGAG R: GAAGAAACAAGAAAAAAAAT	50	167-190
Ci08C05	F: TCCACAGATTGCCCATTA R: CCCTAAAAACCAAGTGACA	55	148-182
mCrCIR01B02	F: TCAACTTCTCTGGTCTCTC R: TTAGCAATATCAACATCAT	55	200-212
mCrCIR01B10	F: AAAAATTGCCCTCTTCTCCT R: TGGTGGTTTTGTTGGTTCTAT	55	160-166
mCrCIR01D06a	F: GATCAAAACATTATTCCAA R: TTTTTCATCAACAAGACTG	50	224-246
mCrCIR01E02	F: TGAATGGTACGGGAAATGC R: CAGGGTCGGTGGAGAGGAT	55	154-166
mCrCIR01F04a	F: AAGCATTTAGGGAGGGTCACT R: TGCTGCTGCTGTTGTTGTTCT	55	184-222

Amorce	Séquence (5' – 3')	Tm	Taille
mCrCIR01F08a	F: ATGAGCTAAAGAGAAGAGG R: GGACTCAACACAACACAA	50	118-148
mCrCIR06A08	F: TTTTGTATGTTGTTTCGTTGTT R: TGGTATTATTTTGTTCATTCTTG	50	124-148
mCrCIR06A12	F: CCCAACAACTCAAACCTC R: TTTTATTTTCGGTCTCCTT	50	84-104
mCrCIR06B05	F: GAACGATGGAATGAAGTG R: ATGTTGATTACGAGACCTT	55	184-250
mCrCIR06B07	F: CGGAACAATAAAAACAAT R: TGGGCTTGTAGACAGTTA	50	98-110
mCrCIR07B05	F: TTTGTTCTTTTGGTCTTTT R: CTTTCTTTCTAGTTTCCC	50	194-248
mCrCIR07D07	F: GCTGATGATACGCACGAACC R: CACAACGCCAAAAACGACTC	55	202-212
mCrCIR07E05	F: GGAGAACAAAACACAATG R: ATCTTTCGGACAATCTT	50	114-118
mCrCIR07E12	F: TGTAGTCAAAAGCATCAC R: TCTATGATTCTGACTTTA	50	116-128
mCrCIR07G11	F: ACATCAAGATTCAAGACCAT R: CAAAAAGTGAAAAAATGAAA	50	200-210
mCrCIR08B08	F: TTCCGTAGATTCCAAAGTG R: GTCCAAGGTCAACAACAAG	50	112-144

II.2.2.5. Marqueurs mitochondriaux et chloroplastiques

L'amplification des ADN des hybrides et des parents est réalisée avec quatre paires de marqueurs mitochondriaux (Froelicher *et al.*, Submitted) et quatre marqueurs chloroplastiques (Cheng *et al.*, 2005; Lotfy *et al.*, 2003b). Ces marqueurs montrent du polymorphisme entre les parents et ont ainsi permis de déterminer l'origine exacte des mitochondries et des chloroplastes de chacun des hybrides.

Tableau 3: Marqueurs PCR mitochondriaux

Amorce	Séquence (5' – 3')	Tm	Taille
rrn5/rrn18-1	F: GGGTGAAGTCGTAACAAGGT R: GAGGTCGGAATGGGATCGGG	50	256-260
nad7/1-2	F: GGAACATAGCATAGGG R: TTTGATATAGGCTCGCT	50	132-158
nad2/4-3	F: TAGTGTTTCGATATAGGGG R: CCCTTCCTTTCTGTTGT	50	240-260
nad5/2-1	F: ACACGGCTCACCAAC R: CTGGTTAGATGCGTGG	50	210-215

Tableau 4: Marqueurs SSR chloroplastiques

Amorce	Séquence (5' – 3')	Tm	Taille
SPCC 11	F: GGCCATAGGCTGGAAAGTCT R: GTTTATGCATGGCGAAAAGG	60	220-250
NTCP9	F: CTTCCAAGCTAACGATGC R: CTGTCCTATCCATTAGACAATG	55	220-240
CCMP 6	F: CGATGCATATGTAGAAAGCC R: CATTACGTGCGACTATCTCC	55	120-150
SPCC 9	F: TGGAGAAGGTTCTTTTCAAGC R: CGAACCCTCGGTACGATTAA	55	200-250

II.3. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES HYBRIDES

La caractérisation morphologique est réalisée sur un certain nombre de critères choisis à partir des descripteurs de l'International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) et de l'Union de Protection des Obtentions Végétales (UPOV). La description a porté sur les feuilles, les fruits et les fleurs des différentes variétés parentales et de leurs hybrides. Cette description est réalisée d'une part sur des variables qualitative (critères observables : forme et bordure du limbe, couleur de la pulpe, type de fleur ...) et d'autre part sur des variables quantitatives (critères mesurables : longueur de la feuille, diamètre du fruit, nombre d'étamines ...).

II.3.1. Description des feuilles

Au mois d'août, nous avons prélevé 30 feuilles de la pousse de printemps, sur 3 arbres par génotype. Sur dix feuilles choisies au hasard parmi les 30, nous avons déterminé la forme du limbe, le type de bordure du limbe, la présence ou l'absence d'ailette et mesuré avec une visse micrométrique l'épaisseur moyenne des feuilles. Puis nous avons scanné, en noir et blanc, et en présence d'une échelle, le limbe des 30 feuilles sans leur pétiole, sur un scanner Epson GT-10000+. A l'aide du logiciel d'analyse d'image LUCIA version 5.0, nous avons mesuré la longueur et la largeur moyenne du limbe des feuilles et la surface foliaire. Nous avons également déterminé le rapport moyen longueur sur largeur de la feuille.

II.3.2. Description des fleurs

Nous avons choisi pour chaque génotype 10 fleurs par arbre (total de 3 arbres) sur lesquelles nous avons déterminé, le type de fleurs, la couleur externe et interne des fleurs, la couleur des anthères. Puis nous avons mesuré à l'aide d'un pied à coulisse, le diamètre moyen du calice des fleurs, la longueur moyenne des pétales, et avons également compté le nombre

d'étamines, le nombre de pétales. Enfin, nous avons évalué la viabilité du pollen en le mettant à germer *in vitro* sur un milieu de germination composé de 100g/l sucrose, 25 mg/l acide borique, 7,5 g/l agar à pH 5,7. Nous avons pu déterminer le pourcentage moyen de germination pour chaque génotype par une série de 5 comptages de 100 grains de pollen au microscope photonique.

II.3.3. Description des fruits

Nous avons effectué les observations sur les fruits en février, sur un échantillon de 10 fruits par arbre (total de 3 arbres) pour chaque génotype. Nos observations ont porté sur les caractéristiques externes des fruits (forme, couleur de la peau, ...), les caractéristiques internes des fruits (couleur de la pulpe, taille des vésicules, ...) et les caractéristiques des graines (forme, couleur des cotylédons, ...). Nous avons également mesuré, le diamètre moyen des fruits, la longueur moyenne des fruits, l'épaisseur moyenne de l'albédo, le diamètre moyen de l'axe des fruits, le pH, l'acidité titrable et le degré Brix. De même, nous avons déterminé le poids moyen des fruits.

II.4. EVALUATION DE LA QUALITE DES FRUITS

II.4.1. Sucres et acides organiques

L'étude porte sur les fruits de la mandarine Willow leaf, du citronnier Eureka et des hybrides issus de leur fusion WLM + EUR. Tous les fruits sont récoltés par intervalle de 15 jours, de décembre à février. Pour chaque génotype, nous avons récolté 4 fruits par arbre sur 3 arbres. Les fruits sont épluchés et la pulpe est congelée dans l'azote liquide puis conservée à -140 °C. La pulpe congelée est lyophilisée et transformée en poudre avant analyse.

II.4.1.1. Mesure de l'acidité titrable et de l'extrait sec soluble (° Brix)

Les mesures d'acidité titrable sont réalisées sur chaque fruit, selon la méthode décrite par Albertini *et al.* (2006). Cent milligrammes de pulpe en poudre sont suspendues dans 5 mL d'eau distillée. La suspension est titrée jusqu'à pH 8,1 avec NaOH 0.1 mol L⁻¹ à l'aide d'un titrateur automatique Mettler DL25 (Mettler-Toledo, France). L'acidité titrable est exprimée en milliéquivalents par gramme de matière fraîche (meq g⁻¹ MF). Les mesures d'extrait sec soluble (° Brix) contenu dans les jus sont réalisées par réfractométrie, à partir d'un mélange de jus de fruits. Le degré Brix est mesuré avec un réfractomètre calibré à 20°C et est exprimé en %.

II.4.1.2. Dosage des acides organiques et des sucres

Le dosage des sucres et acides organiques est réalisé suivant la méthode décrite par Albertini *et al.* (2006). Cent milligrammes de poudre de pulpe de chaque fruit sont dissous dans 5 ml d'eau bi-distillée et centrifugée à 160 g pendant 20 min. Le surnageant est filtré à travers un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,45 μm et analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Les différents acides organiques sont séparés et identifiés par HPLC (Perkin-Elmer, série 200) en phase inverse sur colonne échangeuse d'anions (Spheri-5 RP-18, 220 x 4,6 mm, 5 μm) à 20°C. L'élution est réalisée en mode isocratique dans une phase mobile de KH_2PO_4 25 mM, ajustée à pH 2,4 avec un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'analyse est faite selon les conditions suivantes : équilibration de la colonne - 15 min, élution - 10 min, et rinçage avec de l'acétonitrile 30% - 2 min. Les différents acides organiques sont détectés par un détecteur UV à 210 nm et identifiés en fonction de leur temps de rétention comparé à celui des standards (citrique, malique, ascorbique ...).

Les sucres sont séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne *High Performance Carbohydrate Column* (Waters, 4,6 mm x 250 mm, 4 μm) de silice greffée avec des groupements aminés et maintenue à 35°C. L'élution est en mode isocratique sur une phase mobile acétonitrile / eau (70/30; v/v), avec un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les conditions d'analyse sont les suivantes : équilibration de la colonne - 15 min, élution - 10 min, et rinçage avec de l'acétonitrile 100% - 3 min. La détection est réalisée avec un réfractomètre. Les sucres sont identifiés en fonction de leur indice de réfraction et leur temps de rétention comparé à celui des standards (saccharose, glucose, fructose, xylose, ...).

Le traitement des données est réalisé avec le logiciel TotalChromTM version 6.2 (Perkin-Elmer Instruments, Shelton, U.S.A.). Les concentrations en acides organiques et en sucres sont exprimées en milligrammes par gramme de matière fraîche (mg g^{-1} MF).

II.4.2. Les caroténoïdes

L'analyse des caroténoïdes est réalisée sur les jus de fruits de la mandarine Willow leaf, du citronnier Eurêka et des hybrides issus de leur fusion WLM + EUR, récoltés à pleine maturité (225 jours après l'anthèse). Pour chaque génotype, sont récoltés 15 fruits par arbre sur un ensemble de 3 arbres. Les jus sont pressés et filtrés avec un tamis de maille 1 mm puis placés dans des flacons en verre ambré sous atmosphère d'azote et conservés à - 140°C avant analyse.

II.4.2.1. Extraction des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont extraits selon la méthode décrite par Dhuique-Mayer *et al.* (2005) et Fanciullino *et al.* (2006). L'extraction est faite à partir de 20 g de jus auxquels sont ajoutés 120 mg de carbonate de magnésium pour neutraliser les acides et 35 mL d'éthanol/hexane (4/3, v/v) contenant 0,1% de *ter*-butylhydroxytoluène (BHT) utilisé comme antioxydant. Le lycopène est rajouté au mélange comme étalon interne (4,5 mg.L⁻¹). Le mélange est filtré sous vide avec un entonnoir en verre fritté de porosité 2. Le résidu est ré-extrait avec 35 mL d'éthanol/hexane BHT puis avec 30 mL d'éthanol et 30 mL d'hexane. Le filtrat est transféré dans une ampoule à décanter et est lavé deux fois par 50 mL d'une solution de chlorure de sodium 10%. La phase organique contenant les caroténoïdes est recueillie dans un ballon et évaporée au rotavapor à 40°C. Le résidu est dissout dans 20 mL d'hexane et 20 mL d'hydroxyde de potassium méthanolique à 10 % pour une saponification de 16 heures. La phase hexanique est séparée de la phase méthanolique puis lavée à l'eau distillée jusqu'à la neutralité. Les caroténoïdes de la phase méthanolique sont extraits par ajout de dichlorométhane puis rajoutés à ceux de la phase hexanique. Le mélange est séché au rotavapor et le résidu dissout dans 500 µL de dichlorométhane et 500 µL du mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). L'extrait brut ainsi obtenu est dilué en fonction des variétés avant injection en HPLC.

II.4.2.2. Dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont analysés par HPLC en phase inverse (Agilent 1100 system ; Massy, France) sur une colonne C₃₀ de caractéristiques 250 x 4,6 mm, 5µm YMC (Europ GmbH, Germany) comme décrit par Dhuique-Mayer *et al.* (2005) et Fanciullino *et al.* (2006). La phase mobile est constituée de trois éluants : de l'eau comme éluant A, du méthanol comme éluant B et du MTBE comme éluant C. L'élution est réalisée par gradient avec comme condition initiale 40% A / 60% B; 0-5 min, 20% A / 80% B; 5-10 min, 4% A / 81% B / 15% C; 10-60 min, 4% A / 11% B / 85% C; 60-71 min, 100% B; 71-72 min retour à 40% A / 60% B. Le débit est fixé à 1 mL.min⁻¹ et la température de la colonne à 25°C. L' HPLC est munie d'un détecteur à barrette de diodes enregistrant les signaux aux longueurs d'onde suivantes : 290 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm et 470 nm. Les chromatogrammes sont enregistrés dans l'UV et le visible et intégrés par le logiciel Agilent Chemstation®. Les caroténoïdes sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption dans l'UV et le visible avec ceux de standards. Les composés

sont quantifiés grâce aux courbes de calibration des standards disponibles (β -carotène, β -cryptoxanthine, lutéine, zéaxanthine, lycopène et β -apo-8'-caroténal) et la correction avec l'étalon interne. Les concentrations des différents caroténoïdes sont exprimées en milligrammes par Litre (mg.L^{-1}).

II.5. ETUDE DU TRANSCRIPTOME

II.5.1. Extraction et quantification des ARN totaux

La pulpe des fruits à maturité (225 jours après anthèse) est immédiatement congelée dans l'azote liquide et conservée à -140°C . Les ARN totaux sont extraits à partir de 5g de poudre de pulpe broyée dans l'azote liquide. Les 5 g de pulpe sont resuspendus dans 5 mL de Tris-HCl 0,2 M à pH 8 contenant de l'EDTA 50 mM, NaCl 0,2 M, SDS 2 % (p/v), 5 mL de phénol saturé d'eau, et 25 μL de β -mercaptoéthanol. Une vérification du pH, qui doit être compris entre 6 et 7,5, peut s'avérer nécessaire pour les fruits très acides. Le mélange est ensuite incubé pendant 5 minutes à 50°C . Après centrifugation 10 minutes à 5000 g, la phase aqueuse contenant les ARN est recueillie dans un nouveau tube contenant un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v). Le mélange est centrifugé 10 minutes à 5000 g et le surnageant est placé dans un nouveau tube contenant un volume de CILi 6M. Le mélange est placé à -20°C toute la nuit pour laisser précipiter l'ARN.

Après deux centrifugations (2 minutes à 8000 g) et lavages successifs du culot d'ARN à l'éthanol 70 % (v/v), ce dernier est resuspendu dans 100 μL d'eau traitée au DEPC. Les ARN sont ensuite purifiés à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) et leur qualité vérifiée par migration sur gel d'agarose 1 % (p/v).

La quantification des ARN totaux est réalisée par fluorimétrie avec du RiboGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Seul le complexe ARN-RiboGreen émet de la fluorescence (émission maximum à 520 nm). Ainsi, le dosage n'est pas faussé par la présence de protéines ou de nucléotides libres provenant d'ARN ou ADN dégradés.

II.5.2. Amplification et quantification des ARNm par PCR en temps réel

Les ADNc obtenus à partir des ARN de la pulpe sont amplifiés par PCR semi-quantitative en temps réel à l'aide des amorces des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (*Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, *Zep*) définies par Fanciullino *et al.* (2008) et Mouhaya (2008) (*Nced1*).

Tableau 5: Amorces des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes

Gene	Sequence (5' – 3')	Tm	Taille
<i>Dxs</i>	F: GTGTTTTCAACACACCTGACG R: AAGCCCCGAAGTCTTCCTCAT'	60	120
<i>Psy</i>	F: GGTCGTCCATTTGATATGCTTG' R: CCTAAGGTCCATCCTCATTCT'	60	111
<i>Pds</i>	F: GACAAGGAAGGGTTTCTGTCC R: GCTTAGAAGGACGAGGAGAAG'	60	134
<i>Zds</i>	F: CGATCCTTACATGCCCTTAC R: AGGTCCCTCACGGTACAAAG	60	145
<i>Lcy-b</i>	F: CCCATGTATGACCCATCAAAG R: TGGGAGATGGATCAATCGAG	60	130
<i>Hy-b</i>	F: GGTGCTGGACTTGGCATTAC R: AGCGACTCTCCGGAAATAAG	60	120
<i>Zep</i>	F: TTGGTTGATGGGATTTCTGG R: TCCCCAACCGCTTTAGCTAG	60	134
<i>Nced1</i>	F: GACCAGCAAGTGGTGTTCAA R: AGAGGTGGAAACAGGAGCAA	55	163

L'amplification est réalisée à l'aide d'un appareil LightCycler 2.0 (Roche). La réaction est réalisée dans des tubes capillaires sur un volume total de 10 μL dont : 2 μL Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche), 0,5 μL de chaque amorce à 5 μM , 0,05 μL de Multiscribe Reverse Transcriptase à 50 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Applied Biosystems), 0,05 μL RNase Inhibitor à 50 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Applied Biosystems), et 2,5 μL d'ARN totaux à 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. L'amplification se déroule d'après le programme PCR détaillé dans le Tableau 6.

Tableau 6: Programme PCR en temps réel

	Température °C	Temps	Cycles
Retro Transcription	48	30 min	1
Dénaturation	95	10 min	1
Dénaturation	95	2 s	
Appariement	60	10 s	45
Elongation	72	15 s	
	95	15 s	
	42	1 min	1
Fusion	95	0 s	
Refroidissement	40	20 s	1

Pour chaque gène, la quantification des ARNm est réalisée à l'aide d'une courbe de calibration obtenue sur 10 points de dilutions de l'ARN d'un des échantillons à analyser. L'intensité de la fluorescence mesurée pour chaque échantillon lors de la phase d'élongation est transformée en valeur relative de quantité d'ARNm.

II.5.3. Analyses Microarrays

II.5.3.1. Amplification et marquage des ARNa

L'amplification linéaire des ARN antisens est réalisée par transcription *in vitro* à l'aide du kit AminoAllyl Message Amp™ aRNA Amplification (Ambion), suivant les instructions du fabricant. Les ARN totaux, 1,25 µg, sont incubés dans un tube eppendorf avec 1 µM d'amorce T7 Oligo-dT à 70°C pendant 10 min puis placés sur de la glace. Au tube sont ajoutés 1x de "first strand buffer", 0,5 mM de dNTP, 2,5 U d'inhibiteur de RNase et 5 U de reverse transcriptase. Le tube est incubé à 42°C pendant 2 heures pour la synthèse du premier brin. La synthèse du second brin est réalisée lors d'une incubation de 2 heures à 16°C en présence de 1x de "second strand buffer", 0,1 mM de dNTP, 0,2 U de DNA polymérase, 0,02 U de Rnase H. L'ADNc est immédiatement purifié ou conservé à -20°C. La transcription *in vitro* est réalisée en présence de 3,75 mM de aaUTP, 7,5 mM de dNTP, 3,75 mM d'UTP, 0,4x de T7 "reaction buffer", 3,2 U de T7 polymérase. Le tube est incubé toute une nuit à 37°C. Les ARNa sont purifiés puis couplés aux dyes (0,5 mM de Cy3-UTP ou Cy5-UTP (GE Healthcare)) pendant une heure d'incubation à température ambiante. Les ARNa marqués sont ensuite purifiés et l'incorporation des UTP fluorescents est évaluée sur gel d'agarose.

II.5.3.2. Hybridation des lames microarray et acquisition des données

Trois répétitions biologiques d'ARNa par génotype, marqués au Cy5, sont comparées à une référence constituée d'un mélange équimolaire des ARNa de la totalité des individus à tester, marquée au Cy3. 225 pmol d'ARNa-Cy5 (génotype à tester) sont mélangés à 225 pmol d'ARNa-Cy3 (référence) puis séchés et resuspendus dans un tampon d'hybridation composé de 3x de SSC, 0,1% de SDS, 0,1% d'un ADN témoin et 50% de formamide. L'hybridation et le lavage des lames cDNA microarray sont effectués comme décrit par Martinez-Goday *et al.* (2008). Les lames sont pré-hybridées pendant 30 min dans une solution de 3x de SSC, 0,1% de SDS, 0,1 mg mL⁻¹ de BSA, puis rincées deux fois à l'eau et séchées. Chaque mélange d'ARNa est déposé sur une lame puis recouvert d'une lamelle, de manière à l'étaler par capillarité sur l'ensemble de la surface du microarray. Les lames sont incubées

toute la nuit à 42°C pour l'hybridation. Puis les lames sont lavées dans une solution à 42°C de 2x SSC, 0,1% de SDS pendant 5 min, puis dans une solution de 0,1x de SSC, 0,1% de SDS pendant 10 min à température ambiante et enfin dans 0,1x de SSC pendant 5 min à température ambiante. Les lames microarrays sont séchées puis scannées avec un scanner GenePix 4000B. L'intensité de la fluorescence des spots est analysée avec le logiciel GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices).

II.5.3.3. Analyse des données microarray

Les données sont normalisées de manière à éliminer les erreurs générées lors de la manipulation. Pour observer les différences d'expression, les données sont analysées avec le pack SAM (Significance Analysis of Microarray) (Tusher *et al.*, 2001), utilisant une comparaison par classe avec une FDR (False Discovery Rate) inférieure à 5%. La liste de gènes qui présentent une expression différentielle est analysée avec le logiciel Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) pour déterminer la distribution des gènes selon les différentes catégories fonctionnelles de la terminologie Gene Ontology (GO).

II.6. ANALYSES STATISTIQUES

Nous avons réalisé des analyses de variance à un facteur pour comparer les deux génotypes parents avec les hybrides pour les teneurs en acides organiques, sucres et en caroténoïdes dans la pulpe des fruits. Nous avons également effectué des analyses de variance pour déterminer les différences significatives entre génotypes pour les caractères morphologiques quantitatifs, mais aussi pour comparer les génotypes lors des analyses en PCR en temps réel sur la base des quantités relatives en ARNm pour chacun des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes. Ces analyses sont réalisées avec les logiciels SAS (SAS Institute Inc. 1989) et SigmaStat® 2.0 (SPSS inc.). Nous avons également construit des dendrogrammes à partir des données quantitatives (composés aromatiques, données morphologiques, données d'expression des gènes) en utilisant une classification hiérarchique ascendante. Les dissimilarités correspondent aux distances Euclidiennes entre les génotypes avec, comme méthode d'aggrégation la méthode Ward. Nous avons réalisé la construction des arbres avec le logiciel R (www.R-project.org).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. CARACTERISATION DES GENOMES NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES DES HYBRIDES SOMATIQUES

III.1.1. Introduction

L'hybridation somatique est une composante importante des programmes d'amélioration des agrumes (Grosser *et al.*, 2000). Elle permet l'introgression des gènes provenant d'espèces sexuellement incompatibles ou de génotypes stériles (Grosser *et al.*, 1996b). L'hybridation somatique permet également d'associer les noyaux d'une espèce aux organites cytoplasmiques d'autres espèces, principalement pour la recherche de stérilité mâle nucléo-cytoplasmique mais également afin de transférer certains caractères de résistance à déterminisme cytoplasmique (Barsby *et al.*, 1987; Pelletier *et al.*, 1983; Thomzik et Hain, 1988; Vardi *et al.*, 1987). Chez les agrumes, les protoplastes de feuilles ne présentent pas d'aptitude à la régénération. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser au moins pour l'un des parents des protoplastes de cals embryogènes. Lors de la fusion des protoplastes, il y a addition des composants des deux cellules (génomes nucléaires et cytoplasmiques). Toutefois, il existe des mécanismes de régulation conduisant à l'élimination d'une partie du matériel. L'analyse des génomes cytoplasmiques montre que les chloroplastes ont une hérédité monoparentale avec une ségrégation aléatoire quelle que soit la méthode de fusion (Liu *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2000b; Ollitrault *et al.*, 2000d). En revanche, il apparaît que dans les combinaisons entre protoplastes de feuilles et protoplastes de cals, les mitochondries du parent cal sont systématiquement retrouvées chez les hybrides somatiques (Cabasson *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2000b). Ce résultat a été associé à un rôle potentiel des mitochondries dans l'aptitude à la régénération. (Grosser *et al.*, 1996a). Toutefois quelques exemples de recombinaison mitochondriale ont été observés (Liu *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2000b; Vardi *et al.*, 1989).

Outre la modification du niveau de ploïdie, l'hybridation somatique symétrique entraîne également la formation de nouvelles associations nucléo-cytoplasmiques. En général, les produits de fusion peuvent être des hybrides allotétraploïdes, des hybrides aneuploïdes, des cybrides diploïdes, des autofusions, des multifusions de protoplastes et même de protoplastes parentaux non fusionnés (Ollitrault *et al.*, 2000d; Ollitrault *et al.*, 2007a). Cependant il ressort de la plupart des travaux publiés chez les agrumes que la majorité des plantes régénérées sont des hybrides allotétraploïdes (Grosser *et al.*, 2000). La régénération des plantules étant faite

sans marqueur de sélection, il est nécessaire de pouvoir identifier les hybrides parmi toutes les plantes.

Dans le but de confirmer que le matériel végétal sélectionné est conforme (homogénéité génétique des différentes plantes d'un même hybride) et correspond parfaitement aux attentes (intégrité des génomes, ploïdie, nouvelle combinaison nucléo-cytoplasmique) des objectifs de ce travail de thèse, nous avons réalisé une caractérisation fine de nos hybrides (le cybride WLM + EUR 2x et l'allotétraploïde WLM + EUR 4x) plantés au champ. Nous avons effectué une évaluation de la ploïdie par cytométrie en flux et comptage chromosomique, couplé avec des analyses moléculaires des génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux.

III.1.2. Résultats

III.1.2.1. Evaluation du niveau de ploïdie par cytométrie en flux et comptage chromosomique

L'analyse par cytométrie en flux (Figure 11a et 11b) confirmée par les comptages chromosomiques (Figure 12a et 12b) a montré que le cybride WLM + EUR 2x est bien diploïde ($2n = 2x = 18$) et que l'hybride WLM + EUR 4x est bien tétraploïde ($2n = 4x = 36$).

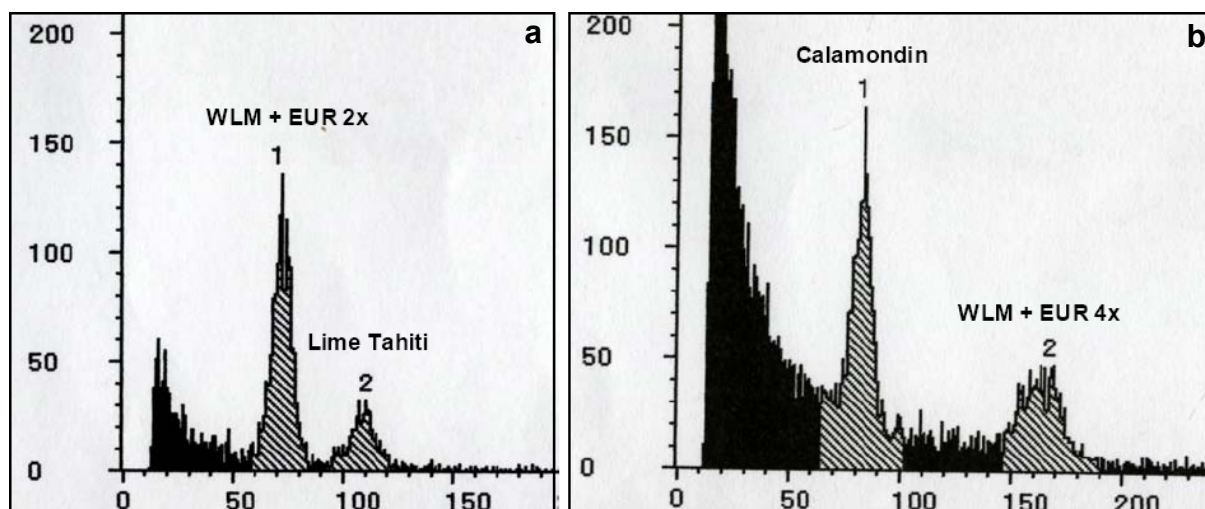


Figure 11: Détermination de la ploïdie de WLM + EUR 2x et WLM + EUR 4x par cytométrie en flux en présence des témoins internes lime Tahiti (*Citrus latifolia*), triploïde et calamondin (*citrus madurensis*), diploïde.

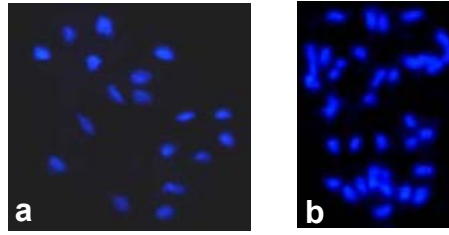


Figure 12: Comptages chromosomiques sur feuille de WLM + EUR 2x (a) et WLM + EUR 4x (b) en métaphase.

III.1.2.2. Caractérisation du génome nucléaire

L'origine génétique des génomes nucléaires des deux hybrides a été étudiée à l'aide de marqueurs moléculaires de type SSR (microsatellites). Les allèles identifiés, après amplification à partir de l'ADN total extrait des feuilles et migration sur gel dénaturant de polyacrylamide pour chaque hybride, ont été comparés à chacun des deux parents pour une même amorce.

Parmi les marqueurs testés sur les parents, 26 ont été sélectionnés pour leur niveau de polymorphisme et d'hétérozygotie. Les résultats montrent que pour ces 26 locus WLM + EUR 4x possède les allèles des deux parents confirmant qu'il est issu de la somme des génomes nucléaires parentaux (Figure 13). De même, le cybride WLM + EUR 2x ne présente que les allèles correspondant au parent citronnier (Figure 13b et 13c) confirmant que le noyau provient en totalité du citronnier sans introgression du mandarinier.

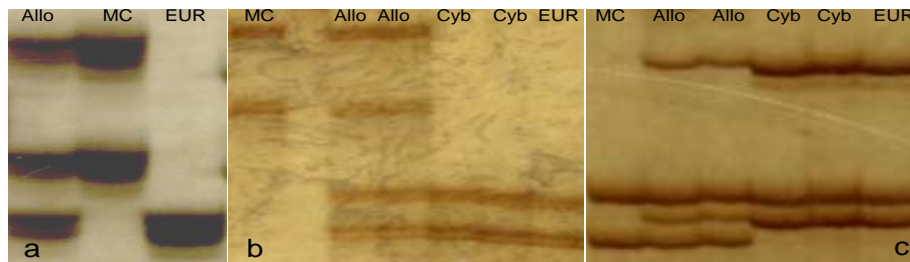


Figure 13: Caractérisation des génomes nucléaires: (a) marqueur Ci07F11, (b) marqueur mCrCIR06B05, (c) marqueur Ci07D06; Parents : MC, mandarinier Willow leaf - EUR, citronnier Eureka; Hybrides: Allo, WLM + EUR 4x - Cyb, WLM + EUR 2x.

III.1.2.3. Caractérisation du génome mitochondrial

Parmi les 4 marqueurs mitochondriaux testés, seulement 3 marqueurs PCR mitochondriaux permettent de distinguer du polymorphisme entre les deux génomes parentaux. L'analyse des hybrides montre que le cybride et l'hybride somatique allotétraploïde possèdent des profils identiques au mandarinier Willow leaf (Figure 14).

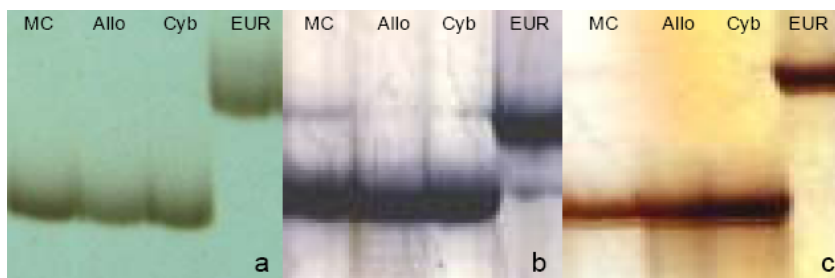


Figure 14: Caractérisation des génomes mitochondriaux: (a) marqueur Nad 2/4-3, (b), marqueur rrn5/rrn18-1, (c), marqueur Nad7/1-2 ; Parents : MC, mandarinier Willow leaf - EUR, citronnier Eureka; Hybrides: Allo, WLM + EUR 4x - Cyb, WLM + EUR 2x.

III.1.2.4. Caractérisation du génome chloroplastique

Parmi les 4 marqueurs chloroplastiques testés, seulement 3 marqueurs SSR chloroplastiques permettent de distinguer du polymorphisme entre les parents. L'analyse a révélé que l'hybride allotétraploïde possède les chloroplastes du mandarinier tandis que le cybride possède les chloroplastes du citronnier (Figure 15)

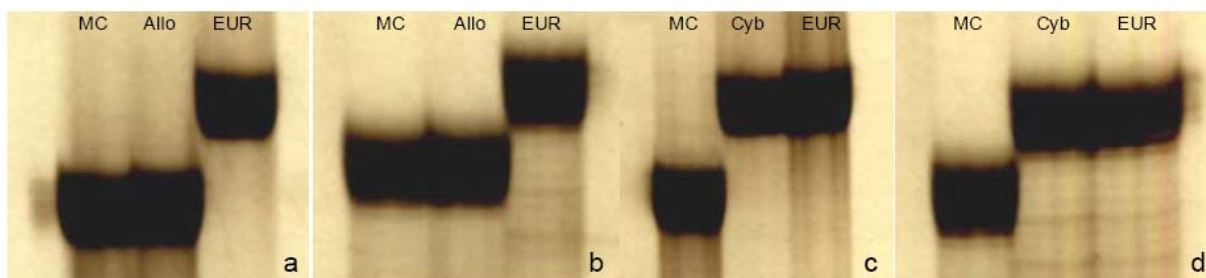


Figure 15: Caractérisation des génomes chloroplastiques: (a) et (c) marqueur ntcp 9, (b) et (d), marqueur sscp 11; Parents : MC, mandarinier Willow leaf - EUR, citronnier Eureka; Hybrides: Allo, WLM + EUR 4x - Cyb, WLM + EUR 2x.

III.1.3. Discussion

Ce travail de caractérisation moléculaire du matériel est un préalable afin de connaître la constitution génétique du matériel végétal étudié. Le sujet de thèse se propose d'évaluer l'impact des génomes cytoplasmiques sur la régulation de l'expression du génome nucléaire et sur l'expression phénotypique, mais également l'expression phénotypique et génomique chez les hybrides somatiques allotétraploïdes. Il était donc indispensable de contrôler la conformité du matériel végétal utilisé pour étudier ces deux aspects. L'étude du cybride WLM + EUR 2x a permis de confirmer qu'il est constitué de 18 chromosomes provenant du citronnier associé au génome chloroplastique du citronnier et au génome mitochondriale du mandarinier. L'étude de l'hybride somatique WLM + EUR 4x a confirmé qu'il possède 36 chromosomes correspondant à la somme des chromosomes du citronnier et du mandarinier associés aux génomes mitochondriaux et chloroplastiques du mandarinier. Aucune perte d'allèle ni recombinaison n'a été observée sur l'ensemble des marqueurs utilisés, ce qui démontre une stabilité génétique du cybride et de l'hybride somatique. Plusieurs cas d'instabilité du génome nucléaire d'hybrides somatiques, marqués par des niveaux de ploïdie plus élevés que ceux attendus, des éliminations et recombinaisons chromosomiques, ont été reportés chez les plantes cultivées. Ainsi chez des hybrides somatiques de *Solanum integrifolium* et *S. sanitwongsei*, il a été observé aussi bien des hybrides tétraploïdes que des hexaploïdes (Iwamoto *et al.*, 2007). Chez *Brassica*, une corrélation positive a été observée entre la fréquence des hybrides avec des chromosomes éliminés et l'éloignement génétique entre espèces (Sundberg et Glimelius, 1991). De même, dans des fusions de protoplastes entre carotte et orge, les plantes régénérées, présentant des phénotypes plus proches de la carotte, se sont révélés être aneuploïdes (Kisaka *et al.*, 1997). Certains milieux de cultures nécessaires pour la régénération des hybrides somatiques seraient favorables à la recombinaison et à l'élimination de chromosomes.

L'analyse des génomes cytoplasmiques avec les marqueurs chloroplastiques et mitochondriaux présentant du polymorphisme entre les deux parents a révélé que WLM + EUR 2x a conservé les chloroplastes du citronnier Eureka et les mitochondries du mandarinier. En revanche, l'hybride allotétraploïde a conservé les chloroplastes et les mitochondries du mandarinier. Chez les agrumes, les hybrides somatiques obtenus par fusion de protoplastes de feuilles et de cals embryogènes héritent du génome mitochondrial du parent cal embryogène et par contre, le génome chloroplastique, ségrège de manière aléatoire (Cabasson *et al.*, 2001; Ollitrault *et al.*, 2000d). Tel est le cas pour nos deux hybrides qui sont

issus de la fusion de protoplastes de cals embryogènes du mandarinier et de protoplastes de feuilles de citronnier. Au cours de la fusion de protoplastes, les organites cytoplasmiques parentaux sont réunis momentanément avant élimination des organites d'un des deux parents. Au cours de cette étape, il est possible que des recombinaisons soient observées entre les mitochondries des parents (Belliard *et al.*, 1979). Chez des cybrides et des hybrides somatiques d'agrumes, des recombinaisons mitochondriales ont quelques fois été observées (Cheng *et al.*, 2002; Vardi *et al.*, 1989). Les deux hybrides d'agrumes que nous avons étudiés présentent, pour les 3 locus testés, les allèles spécifiques de la mitochondrie du mandarinier, ce qui suggère l'absence de recombinaison.

L'intégrité confirmée des hybrides nous permet d'aborder, avec WLM + EUR 2x, l'étude de l'impact des interactions nucléo-cytoplasmiques sur la régulation de l'expression génétique et de l'expression phénotypique, particulièrement de l'interaction noyau-mitochondrie; et avec WLM + EUR 4x, l'étude de l'expression phénotypique et génomique chez les allotétraploïdes.

III.2. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE COMPAREE DU CYBRIDE ET DE SES PARENTS

III.2.1. Introduction

La production d'hybrides diploïdes associant le noyau d'une espèce aux organites cytoplasmiques d'une autre espèce, par hybridation somatique ou par des croisements interspécifiques suivies de backcross, est une voie d'amélioration utilisée chez diverses plantes cultivées. La substitution de certains cytoplasmes a révélé des avantages agronomiques telles que la stérilité mâle cytoplasmique (Prakash *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 1997), la tolérance à la sécheresse (Uprety et Tomar, 1993), le renforcement de la résistance aux herbicides (Beversdorf *et al.*, 1980), une amélioration de la résistance aux maladies (Banga *et al.*, 1984). D'autre part, les inconvénients résultants d'une incompatibilité entre un cytoplasme étranger et le noyau peuvent se manifester par une morphologie anormale des tiges, des feuilles et des fleurs, la réduction de la résistance au froid et des carences chlorophylliennes (Kato *et al.*, 1990). Ces hybrides, appelés cybrides, constituent donc de bons supports pour les études sur le rôle du cytoplasme dans le déterminisme des caractères phénotypiques.

Chez les agrumes, un certain nombre de cybrides ont été produit ces dernières années dans des fusions somatiques classiques (Ollitrault *et al.*, 2007a). Ces cybrides sont régénérés en particulier lors de fusions entre protoplastes de cals et protoplastes de feuilles. En effet, il a été observé que certains hybrides diploïdes issus de ces fusions combinaient généralement le génome nucléaire du parent feuille avec les mitochondries du parent cal (Cabasson *et al.*, 2001; Grosser *et al.*, 1996a; Moreira *et al.*, 2000b; Saito *et al.*, 1993). Par contre, le génome chloroplastique, ségrège de manière aléatoire (Moreira *et al.*, 2000b; Ollitrault *et al.*, 2000d). Au CIRAD, une dizaine de cybrides ont été produit lors de fusions somatiques classiques sur différentes combinaisons entre, le mandarinier (*Citrus deliciosa* Ten.), le citronnier [*Citrus limon* (L.) Burm.], le clémentinier (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), et le kumquat [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swing.] (Ollitrault *et al.*, 2001). Les cybrides ainsi que leurs parents ont été greffé sur volkameriana (*Citrus limonia* Osb.) et planté, en trois exemplaires, de manière aléatoire sur une même parcelle de la Station de Recherches Agronomiques INRA/CIRAD de San Giuliano. Parmi ces cybrides, nous avons choisi d'étudier au cours de cette thèse, un cybride nommé WLM + EUR 2x obtenu par hybridation somatique entre des protoplastes de feuille du citronnier cv 'Eureka' et des protoplastes de cal du mandarinier cv 'Willow Leaf'.

Dans le but de déterminer les variations phénotypiques, liées aux interactions entre le génome nucléaire du citronnier et le génome mitochondrial du mandarinier, nous avons effectué une description morphologique comparée de WLM + EUR 2x et de ses deux parents. Cette description a porté principalement sur les feuilles, les fleurs et les fruits à maturité

III.2.2. Résultats

III.2.2.1. Description des feuilles

Les mesures effectuées sur les feuilles de la pousse de printemps pour les trois génotypes sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7: Caractères foliaires du cybride comparés à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 2x	EUR
Longueur moyenne du limbe (cm)	8,21 ± 0,08 ^a	12,03 ± 0,14 ^b	11,81 ± 0,10 ^b
Largeur moyenne du limbe (cm)	2,26 ± 0,02 ^a	5,45 ± 0,05 ^b	5,12 ± 0,06 ^b
Rapport moyen L / l	3,64 ± 0,04 ^a	2,21 ± 0,02 ^b	2,32 ± 0,03 ^b
Surface foliaire du limbe (cm ²)	11,70 ± 0,21 ^a	42,34 ± 0,77 ^b	37,89 ± 0,69 ^c
Epaisseur moyenne du limbe (mm)	0,28 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^c
Forme du limbe	Lancéolée	Elliptique	Elliptique
Bordure du limbe	Lisse	Ondulée	Ondulée

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative à P < 0,05

Le mandarinier et le citronnier présentent des différences sur la morphologie de leurs feuilles. En effet, pour les caractères quantitatifs (longueur, épaisseur, ...), le citronnier présente des feuilles plus longues et plus larges que les feuilles du mandarinier (Tableau 7). La forme des feuilles est elliptique pour le citronnier et lancéolé pour le mandarinier (Figure 16). Le mandarinier présente des feuilles avec une surface foliaire très faible comparée à celle des feuilles du citronnier, qui en font trois fois plus (37,89 contre 11,7 cm²). Les feuilles du citronnier, sont également plus épaisses que celle du mandarinier avec respectivement 0,37 mm et 0,28 mm, et présentent des bordures de limbes respectivement ondulée et lisse (Tableau 7).

WLM + EUR 2x présente des caractéristiques foliaires très proches de celles du citronnier (Tableau 7). En effet, pour les caractères longueur, largeur, forme et bordure du limbe, il n'y a pas de différences significatives entre le citronnier et WLM + EUR 2x. Le cybride se différencie quand même de ses parents avec une surface foliaire plus grande, 42,34 cm² contre 37,89 cm² pour le citronnier et 11,70 cm² pour le mandarinier, et une épaisseur de feuilles intermédiaire au citronnier et au mandarinier.



Figure 16: Morphologie des feuilles du citronnier Eureka (gauche), du cybride WLM + EUR 2x (centre), et du mandarinier Willow leaf (droite).

III.2.2.2. Description des fleurs

Les mesures effectuées sur les fleurs du cybride et de ses parents sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8: Caractères floraux du cybride comparés à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 2x	EUR
Diamètre moyen de la fleur (mm)	4,8 ± 0,1 ^a	7,1 ± 0,2 ^b	7,1 ± 0,1 ^b
Longueur moyenne des pétales (mm)	12,3 ± 0,3 ^a	20,4 ± 0,3 ^b	19,2 ± 0,4 ^b
Nombre moyen de pétales	7,3 ± 0,3 ^a	5,1 ± 0,1 ^b	5,1 ± 0,1 ^b
Nombre moyen d'étamines	13 ± 1 ^a	26 ± 1 ^b	36 ± 1 ^c
Taux de fleurs hermaphrodites (%)	100	26,7	26,7
Taux de fleurs mâles (%)	0	83,3	83,3
Taux de germination du pollen (%)	73,7 ± 5,2 ^a	2,3 ± 0,5 ^b	1,4 ± 0,5 ^b
Couleur externe de la fleur	Blanche	Anthocyane	Anthocyane
Couleur interne de la fleur	Blanche	Blanche	Blanche
Couleur des anthères	Jaune	Jaune	Jaune

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative à $P < 0,05$

Les observations de l'appareil floral font ressortir une différenciation entre le mandarinier et le citronnier. Le mandarinier montre un appareil floral de taille réduite, faiblement coloré (Figure 17) et très fertile à l'opposé de celui du citronnier qui est coloré et de grande taille mais moins fertile (Tableau 8). En effet, pour ce qui est de l'envergure de l'appareil floral, le diamètre du calice des fleurs de mandarinier (4,8 mm) est réduit comparé à celui des fleurs de citronnier (7,1 mm). Il en est de même de la longueur des pétales avec 12,3 mm pour le mandarinier contre 19,2 mm pour le citronnier. De même, le nombre d'étamines par fleur est trois fois plus grand chez le citronnier que chez le mandarinier, soit respectivement 36 et 13. En terme de coloration, les fleurs du citronnier sont anthocyanées à l'extérieur tandis que celles du mandarinier sont toutes blanches. Toutefois, le mandarinier se caractérise par une absence de fleur mâle et un fort taux de germination de pollen (73 %), contrairement aux fleurs de citronnier, qui sont constituées à 83 % de mâles avec un très faible taux de germination de pollen (< 2 %).



Figure 17: Morphologie des fleurs du citronnier Eureka (gauche), du cybride WLM + EUR 2x (centre), et du mandarinier Willow leaf (droite).

Le cybride présente des fleurs très proches de celles du citronnier en coloration, fertilité et en taille. En effet, les fleurs de WLM + EUR 2x sont aussi grandes que celles du citronnier (Figure 17), avec des diamètres moyens (7,1 mm) et des longueurs moyennes de pétales (20,4 mm) sensiblement égales. De très nombreuses fleurs sont mâles (83%) et seulement 26% sont hermaphrodites et anthocyanées comme chez le citronnier. De même, le taux de germination du pollen est aussi très faible (2,3 %). En revanche il est important de noter que les fleurs de WLM + EUR 2x diffèrent de celles du citronnier par leur nombre d'étamines, intermédiaire à celui des fleurs de ses parents.

III.2.2.3. Description des fruits

Les observations effectuées au mois de février sur les fruits, de chacun des trois génotypes sont consignées dans le tableau 9.

Tableau 9: Caractéristiques des fruits du cybride comparées à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 2x	EUR
Poids moyen du fruit (g)	60,3 ± 3,5 ^a	222,2 ± 8,3 ^b	224,7 ± 10,7 ^b
Diamètre moyen du fruit (mm)	53,6 ± 0,8 ^a	71,5 ± 1,5 ^b	71,1 ± 1,4 ^b
Longueur moyenne du fruit (mm)	39,9 ± 1,6 ^a	101,9 ± 4,2 ^b	98,6 ± 4,2 ^b
Epaisseur de la peau (mm)	3,3 ± 0,1 ^a	8,1 ± 0,5 ^b	7,8 ± 0,3 ^b
Diamètre de l'axe du fruit (mm)	14,6 ± 1,1 ^a	9,0 ± 0,4 ^b	10,6 ± 0,9 ^b
Nombre de segments par fruit	11 ± 0,3 ^a	9 ± 0,2 ^b	9 ± 0,4 ^b
Nombre de graines par fruit	15 ± 2 ^a	3 ± 2 ^b	2 ± 1 ^b
Nombre moyen d'embryons par graine	4 ± 0,2 ^a	2 ± 0,3 ^b	2 ± 0,4 ^b
° Brix (%)	9,5 ± 1E-8 ^a	6,1 ± 4E-8 ^b	5,4 ± 0,03 ^c
Acidité titrable (meq g ⁻¹ de MF)	0,07 ± 5E-3 ^a	0,90 ± 0,01 ^b	0,82 ± 0,01 ^c
Forme du fruit	Aplatie	Ellipsoïde	Ellipsoïde
Forme de la base du fruit	Concave	Convexe	Convexe
Forme de l'apex du fruit	Déprimée	Mammiforme	Mammiforme
Texture de la surface du fruit	Papillée	Piquetée	Piquetée
Couleur de la peau du fruit	Jaune orangé	Jaune	Jaune
Extrémité du style du fruit	Fermée	Fermée	Fermée
Nature des glandes à huiles	Voyantes	Voyantes	Voyantes
Adhérence de la peau	Faible	Forte	Forte
Nature de la peau des segments	Fragile	Résistante	Résistante
Adhérence des segments entre eux	Très faible	Moyenne	Moyenne
Couleur de la pulpe	Orange	Jaune clair	Jaune clair
Taille des vésicules	Moyenne	Moyenne	Moyenne
Forme des vésicules	Moyenne	Etroite	Etroite
Couleur du mésocarpe	Jaune orangé	Blanc	Blanc
Axe du fruit	Creux	Semi-creux	Semi-creux
Forme de l'axe	Irrégulier	Régulier	Régulier
Forme des graines	Deltoïde	Ovoïde	Ovoïde
Texture de la surface de la graine	Lisse	Lisse	Lisse
Couleur de la surface de la graine	Crème	Crème	Crème
Couleur des cotylédons	Vert clair	Ivoire	Ivoire
Couleur de la chalaze	Pourpre	Pourpre	Pourpre

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative à P < 0,05

Comme pour les feuilles et les fleurs, les fruits du mandarinier et du citronnier se distinguent sur la quasi-totalité des critères observés (Figure 18).



Figure 18: Coupe transversale des fruits du citronnier Eureka (droite), du cybride WLM + EUR 2x (centre), et du mandarinier Willow leaf (gauche).

Le citronnier présente des fruits jaunes avec une texture piquetée et une forme allongée (98,6 mm), à l'opposé des fruits du mandarinier qui sont jaunes orangés de texture papillée et de forme aplatie (40 mm de long). De même, les fruits du mandarinier présentent une peau fine (3,3 mm) facile à éplucher, là où ceux du citronnier ont une peau épaisse (7,8 mm) avec une forte adhérence. Les caractéristiques internes du fruit révèlent chez le citronnier, des segments à la peau résistante, des vésicules étroites avec un axe du fruit semi-creux et régulier. Les fruits du mandarinier ont une peau de segment fragile, des vésicules moyennes avec un axe creux et irrégulier (Tableau 9).

Les graines montrent également une variabilité entre le mandarinier et le citronnier. En effet, les graines de mandarines sont de forme deltoïde avec des cotylédons de couleur vert clair et possèdent en moyenne 4 embryons par graine. Les graines contenues dans les citrons sont de forme ovoïde avec des cotylédons de couleur ivoire et possèdent en moyenne 2 embryons par graine. Les fruits du citronnier contiennent moins de graines que les fruits du mandarinier, avec une moyenne de 2 graines par citron contre 15 graines par mandarine. Il faut noter quand même, que les fruits du citronnier et du mandarinier présentent un certain nombre de caractères en commun, comme l'extrémité fermée du style, des glandes à huiles voyantes et des graines lisses (Tableau 9).

Les fruits du cybride, sont très similaires aux fruits de son parent citronnier, autant pour leurs caractéristiques externes et internes que pour celles des graines (Tableau 9). Il s'en distingue significativement uniquement pour les valeurs de degré Brix et d'acidité titrable légèrement supérieures.

III.2.3. Discussion

Les observations morphologiques montrent une différenciation phénotypique importante entre les parents citronnier et mandarinier, que ce soit au niveau foliaire, au niveau floral, ou au niveau des caractéristiques externes et internes du fruit. En effet, le mandarinier se distingue très bien du citronnier par le rapport Longueur/largeur (L/l) de la feuille, par le taux de germination de son pollen, par le nombre de graines par fruit ou par l'acidité titrable. Cette différenciation phénotypique importante entre le citronnier Eureka et le mandarinier Willow leaf, a également été observées lors des études sur les composés d'arômes de feuilles (Fanciullino *et al.*, 2005; Gancel *et al.*, 2003).

Le cybride WLM + EUR 2x, par ses génomes, ne diffère du citronnier que par ses mitochondries de mandarinier. Les résultats de l'observation des caractères morphologiques, d'une manière générale, vont dans le sens d'une absence de différence significative entre le citronnier et WLM + EUR 2x. Ainsi, la substitution de la mitochondrie de citronnier par celle du mandarinier, n'aurait pas d'effet notable sur l'élaboration des caractères phénotypiques liés aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. Il est également intéressant de noter que le taux de germination pollinique du cybride est similaire à celui du citronnier, 2,3 et 1,4 % respectivement, tandis que le mandarinier présente un taux de germination très nettement supérieur (73,7 %). La nouvelle interaction nucléo-mitochondriale n'a donc pas permis de restaurer la fertilité du citronnier. En effet, la stérilité du citronnier associée à une asynapsie et inductible par l'environnement (froid) serait d'origine nucléaire (Pereau-Leroy, 1950). Seules quelques différences significatives ont pu être observées entre le cybride et le citronnier, notamment pour le nombre d'étamines et l'épaisseur du limbe. Ces différences peuvent être le résultat de nouvelles interactions entre le génome nucléaire de citronnier et la mitochondrie du mandarinier. En effet, les interactions nucléo-mitochondriales sont connues pour être à l'origine de variations phénotypiques chez différents cybrides, notamment pour leurs organes floraux (Farbos *et al.*, 2001; Linke *et al.*, 2003; Murai *et al.*, 2002; Pelletier et Budar, 2007; Teixeira *et al.*, 2005a). Le développement des fleurs ne dépend pas seulement de l'action d'un ensemble de gènes nucléaires, mais aussi d'une coordination avec l'action de la mitochondrie (Carlsson *et al.*, 2008). La mitochondrie du mandarinier, génotype caractérisé par un faible nombre d'étamines, a probablement régulé l'expression de certains gènes nucléaires du citronnier, conduisant à un nombre d'étamines significativement inférieur au citronnier et intermédiaire aux deux parents.

La différenciation observée au niveau de l'épaisseur du limbe chez le cybride, épaisseur intermédiaire à celle des feuilles du citronnier et du mandarinier, peut également être associée à l'interaction entre le noyau de citronnier et la mitochondrie du mandarinier. Chez *Brassica*, Malik *et al.* (1999) et Leino *et al.* (2003) ont observés une réduction du développement végétatif lié aux interactions nucléo-mitochondriales. Les feuilles des cybrides sexués (alloplasmes), bien que plus petites, ont montré une très grande ressemblance morphologique avec celles de *B. juncea* (Malik *et al.*, 1999). Nos observations sur WLM + EUR 2x ne montrent pas de réduction apparente de développement de son système végétatif, vu qu'il présente un port d'arbre semblable à celui du parent citronnier. De plus, le cybride montre en moyenne des feuilles avec une surface foliaire légèrement plus importante que celle du citronnier. Cette observation pourrait être liée à un effet positif de l'interaction noyau mitochondrie sur le développement végétatif.

La faiblesse des modifications entraînées au niveau phénotypique par la nouvelle interaction entre le génome nucléaire de citronnier et la mitochondrie du mandarinier, pourrait s'expliquer par une distance génétique entre les deux parents relativement faible. En effet, le citronnier et le mandarinier bien qu'appartenant à deux espèces différentes d'un point de vue botanique, sont sexuellement compatibles. Le génome nucléaire du citronnier, d'origine interspécifique, renferme par ailleurs une proportion importante d'allèles provenant du pool des mandarinières (Nicolosi *et al.*, 2000). Les modifications phénotypiques les plus marquantes, sont généralement observées lors d'une relative incompatibilité entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial (Allen, 2005; Bogdanova, 2007; Hanson, 1991). Cette incompatibilité pouvant apparaître suite à la formation de cybrides, entre des génotypes relativement éloignés (Allen, 2005; Atienza *et al.*, 2007), ou alors avec des réarrangements et/ou mutations cytoplasmiques (Hanson, 1991; Leino *et al.*, 2003).

Ces observations montrent que, d'une manière générale, l'interaction entre le génome nucléaire de citronnier et le génome mitochondrial de mandarinier, affecte très peu les caractères phénotypiques des feuilles, des fleurs et des fruits. Nous pouvons en conclure que, l'information génétique impliquée dans la différenciation phénotypique entre le citronnier et le mandarinier, est portée par le noyau et que l'expression de ces gènes nucléaires est peu influencée par l'interaction avec le génome mitochondrial. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus pour les composés aromatiques, par Fanciullino *et al.* (2005), sur différents cybrides d'agrumes. Nos prochaines observations sur les composés impliqués dans la qualité des fruits d'agrumes (sucres, acides et caroténoïdes), nous donnerons des informations supplémentaires sur la variabilité phénotypique associée à la création de cybrides.

III.3. INFLUENCE DE L'ORIGINE DES MITOCHONDRIES SUR LA QUALITE DES FRUITS CHEZ UN CYBRIDE D'AGRUMES

III.3.1. Résumé de l'article

Introduction

Les sucres, les acides organiques et les caroténoïdes sont des composés participant fortement à la qualité des fruits chez les agrumes. Ces composés sont d'importants indicateurs de la saveur, de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits. Dans le cadre du programme d'amélioration des agrumes du CIRAD, différents cybrides sont créés par électrofusions de protoplastes. Le cybride nommé WLM + EUR 2x, est issu de la fusion entre le mandarinier Willow leaf (*Citrus deliciosa* Ten.) et le citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm.), et présente les génomes nucléaire et chloroplastique du citronnier avec le génome mitochondrial du mandarinier. L'objectif de notre travail est d'évaluer l'influence d'un changement du génome mitochondrial sur la qualité des fruits chez un cybride.

Matériel et méthodes

Les variations qualitatives et quantitatives des différents composés sucres, acides et caroténoïdes sont analysées par HPLC dans la pulpe des fruits du cybride tout en les comparant aux fruits des deux parents mandarinier Willow leaf et le citronnier Eureka. Ainsi, l'impact de la nouvelle mitochondrie sur la qualité des fruits est étudié au cours de la phase III de développement des fruits, correspondant à la période de maturité.

Résultats et discussions

Le citronnier et le mandarinier présentent des différences quantitatives très marquées dans la biosynthèse des sucres et des acides organiques, et des différences qualitatives et quantitatives pour la synthèse des caroténoïdes. En effet, le citronnier contient jusqu'à 5 fois plus d'acide citrique que le mandarinier tandis que pour les sucres, les fruits du citronnier contiennent 6 fois moins de saccharose que ceux du mandarinier. De même, les fruits du citronnier présentent que deux caroténoïdes (β -carotène et β -cryptoxanthine) et à des concentrations allant jusqu'à 50 fois moins comparé au mandarinier plus riche en caroténoïdes.

La synthèse des acides organiques est légèrement plus élevée dans la pulpe des fruits du cybride que dans celle des fruits du citronnier Eureka. Cependant, aucune différence n'est

observée pour la synthèse des sucres et des caroténoïdes entre le cybride et le citronnier. Les résultats confirment que l'essentiel de l'information génétique contrôlant la différenciation entre mandarinier et citronnier pour la biosynthèse des sucres, des acides organiques et des caroténoïdes est contenu dans le génome nucléaire. La nouvelle interaction mitochondrie-noyau n'entraîne par ailleurs probablement pas chez le cybride de modification dans la régulation des gènes nucléaires concernés. Les résultats obtenus sont intéressants pour les programmes d'amélioration des agrumes. En effet, ils montrent que chez les agrumes, la création de cybride peut être utilisée comme stratégie pour transmettre des caractères d'intérêt liés au génome mitochondrial, comme la stérilité mâle, sans affecter les qualités organoleptiques et nutritionnelles du fruit.

III.3.2. Article

Titre: Influence of Mitochondria Origin on Fruit Quality in a Citrus Cybrid

**BASSENE, J. B.; BERTI, L.; CARCOUET, E.; DHUIQUE-MAYER, C.;
FANCIULLINO, A. L.; BOUFFIN, J.; OLLITRAULT, P.; FROELICHER, Y.**

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, 56, p. 8635 - 8640.

Influence of Mitochondria Origin on Fruit Quality in a Citrus Cybrid

JEAN-BAPTISTE BASSENE,[†] LILIANE BERTI,[‡] ELODIE CARCOUET,[§]
 CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,^{||} ANNE-LAURE FANCIULLINO,[†] JEAN BOUFFIN,[†]
 PATRICK OLLITRAULT,[†] AND YANN FROELICHER^{*,†}

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),
 UPR Multiplication végétative, F-20230 San Giuliano, France, Université de Corse, UMR CNRS
 6134, Laboratoire Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal, Quartier Grossetti, BP 52,
 20250 Corte, France, Institut National de Recherche Agronomique (INRA), UR GEQA, San Giuliano,
 F-20230 San Giuliano, France, and CIRAD, UMR QUALISUD, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

Sugar, organic acid, and carotenoid are the most important indicators of fruit taste and nutritional and organoleptic quality. These components were studied on fruit pulp of the cybrid between Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) and Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] and the two parents. The cybrid possessed nuclear and chloroplast genomes of Eureka lemon plus mitochondria from Willow leaf mandarin. The impact of new mitochondria on fruit quality was studied during the mature period. Levels of organic acids were slightly higher in the cybrid fruit pulp than in Eureka lemon. No significant difference in sugar and carotenoid content was observed between the cybrid and the lemon. Results confirm that the main genetic information for the biosynthesis of sugars, organic acids, and carotenoids is contained in the nucleus. In *Citrus*, cybridization can be used as a strategy to breed specific traits associated with mitochondrial genomes, such as male sterility, without affecting the main organoleptic and nutritional qualities.

KEYWORDS: *Citrus*; diploid somatic hybrid; cybrid; sugars; organic acids; carotenoids; fruit quality

INTRODUCTION

Nutritional and organoleptic fruit qualities are currently very important objectives for plant breeders. For citrus cultivars, fruit quality must be managed at the same time as other characters, such as seedlessness, productivity, harvesting period, and sometimes tolerance to diseases (1). Moreover sexual breeding of citrus is a difficult task mostly because of the highly heterozygous genetic structure of modern species, including sweet orange, grapefruit, and lemons, that are the result of interspecific hybridization (2). For these species, breeding methods are needed that do not affect the complex genetic structures that define the pomological and organoleptic characteristics of the species (3).

Somatic cybridization has been proposed as a potential approach to breed citrus cultivars for specific traits, such as seedlessness or tolerance traits, as well as to slightly modify phenological or quality traits for diversification of the cultivar. Special interest is paid to transfer cytoplasmic male sterility (4, 5), and Guo et al. (6) tried to transfer the

cytoplasmic male sterility of the satsuma mandarin to seedy citrus cultivars. A cybrid is a cytoplasmic hybrid possessing the nucleus of one species and the mitochondria and/or chloroplast of another species. In citrus, cybrids could be obtained by asymmetric fusion between irradiated protoplast with a destroyed nucleus and an iodoacetate-treated protoplast (7, 8), but most citrus cybrids have been obtained by symmetric hybridization (9–11). Recently, the production of an alloplasmic hybrid via cytoplasm–protoplast fusion has been developed in citrus (12). In the case of somatic hybridization between a mesophyll protoplast and an embryogenic callus protoplast, the cybrid systematically contained mitochondria from the embryogenic callus (13, 14).

In plant breeding, male sterility and tolerance traits determined cytoplasmically have been the most common objective of such strategies (15–19). A cybrid with new mitochondrial genomes could also be used to improve breeding systems in terms of flower morphology and attractiveness to insects (19–22).

Citrus cybrids are a good model to study the impact of nucleo–cytoplasmic interactions on internal fruit quality at the basic research level. It has been shown that cybridization can have an impact on aroma. Fanciullino et al. (23) found that, for volatile compounds of leaves, the cybrids were very close to their nucleus-giving parent; however, some nucleo–cytoplasmic

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +33(0)495595911. Fax: +33(0)495595937. E-mail: froelicher@cirad.fr.

[†] UPR Multiplication végétative, CIRAD.

[‡] Université de Corse.

[§] INRA.

^{||} UMR QUALISUD, CIRAD.

interactions occurred, such as the synthesis of more monoterpene alcohols and sesquiterpene in the kumquat and clementine cybrid.

The acidity of the citrus fruit results directly from the citric acid cycle. The mitochondria are the site of biosynthesis in the citric acid cycle even if the genes involved are located in the genome of the nucleus. Carotenoid biosynthesis is located in the plast or the chloroplast (24), and all of the genes are located in the nucleus (25, 26). The biosynthesis of sugars is much more complex because the chloroplast and mitochondria play an important role in photosynthesis and respiration, respectively.

Assessing the impact of the nucleo–cytoplasmic interaction on citrus fruit quality would allow us to estimate (i) how cybridization could be used to breed traits, such as seedlessness or resistance, without modifying organoleptic and nutritional quality or, (ii) in contrast, how it could enable modification of quality characters to better fit consumer requirements as a strategy for diversification of cultivars.

One cybrid between Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) and Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] has been produced by symmetric fusion by CIRAD (27). This cybrid is of great interest because the two parents display very strong differentiation in fruit quality. Willow leaf mandarin is an orange sweet fruit, while Eureka lemon is a yellow acidic fruit. The phylogenetic origin of the cytoplasm from the two parents is different. Willow leaf mandarin belongs to *C. reticulata*, while the origin of the lemon cytoplasm is *C. maxima* (pummelo taxon) (2, 28). The aim of our study was to determine the effects of this new nucleo–mitochondria interaction on the biosynthesis of sugars, acids, and carotenoids, which are widely recognized to be important components of fruit and juice quality (29).

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials. The study was conducted on fruits of Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.), Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.], and their cybrid called WLM + EUR (*Citrus deliciosa* Ten.) and [*Citrus limon* (L.) Burm.]. WLM + EUR was produced by symmetric protoplast fusion (27). The two parents and WLM + EUR mature budwood were all grafted onto volkameriana rootstock (*Citrus limonia* Obs.) and randomly planted in the same field at the Station de Recherche Agronomiques (INRA/CIRAD) in San Giuliano (Corsica, France) in 2002.

Genetic Characterization. Genetic characterization was performed according to previously published methods. Ploidy level was analyzed by flow cytometry (30). All molecular markers were studied by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in sequencing gels with silver staining. Molecular characterization of the nuclear genome was performed using 26 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers (31). The chloroplast genome was characterized using four chloroplastic SSR markers (32, 33). The origin of the mitochondrial genome was studied using four universal polymerase chain reaction (PCR) primers described by Mouhaya et al. (28) (manuscript submitted).

Fruit Sampling for Analysis of Acidity and Sugars. Fruits were harvested at 15 day intervals on three trees per variety at stage III of fruit development (34) from December to February. Four fruits were collected from each tree at each sampling. Fruits were individually peeled, and their pulp was frozen in liquid nitrogen and stored at -140°C . The frozen fruit pulp was then lyophilized and powdered before analysis. The extractions for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis were made with the different samples from the three trees, for each genotype.

Titrateable Acidity. A total of 100 mg of powdered pulp was suspended in 5 mL of bidistilled water. Titrateable acidity was determined by titration to pH 8.1 with 0.1 mol L^{-1} NaOH, using an

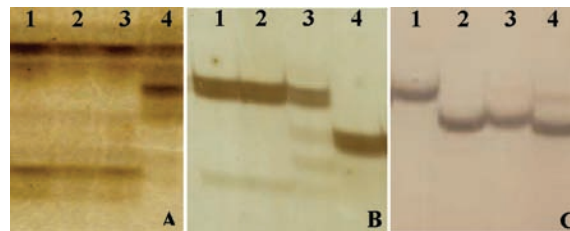


Figure 1. Analysis of genetic constitution of WLM + EUR: (A) nuclear SSR marker mCrCIR07E12, (B) chloroplastic SSR marker ntcp9, and (C) mitochondrial primer rrm5/rrn18-1. Lane 1, Eureka lemon; lanes 2 and 3, two clones of WLM + EUR; and lane 4, Willow leaf mandarin.

automatic Mettler titrator DL25 (Mettler-Toledo, France). Titrateable acidity was expressed as milliequivalents per gram of fresh pulp ($\text{meq g}^{-1}\text{ fp}$).

Analysis of Organic Acids and Sugars. A total of 100 mg of powdered pulp were dissolved in 5 mL of bidistilled water and centrifuged at 160g for 20 min. The supernatant was filtered through 25 mm syringe filters, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ cellulose acetate membranes (VWR). Organic acids and sugars were analyzed with an analytical HPLC unit (Perkin-Elmer, Series 200, France) as previously described by Albertini et al. (35).

Data was acquired using TotalChrom software for Windows version 6.2 (Perkin-Elmer Instruments, Shelton, CT). Concentrations of organic acids and sugars were expressed as milligrams per gram of fresh pulp ($\text{mg g}^{-1}\text{ fp}$).

Carotenoid Analysis. Carotenoid analysis was performed on juice sacs of fruits of Willow leaf mandarin, Eureka lemon, and WLM + EUR harvested at full maturity, 225 days after anthesis (DAA). Carotenoids were analyzed by HPLC using an Agilent 1100 system (Massy, France). Carotenoids were extracted, identified, and quantified as described by Dhuique-Mayer et al. (36) and Fanciullino et al. (37). The concentration of each carotenoid was expressed as mg L^{-1} .

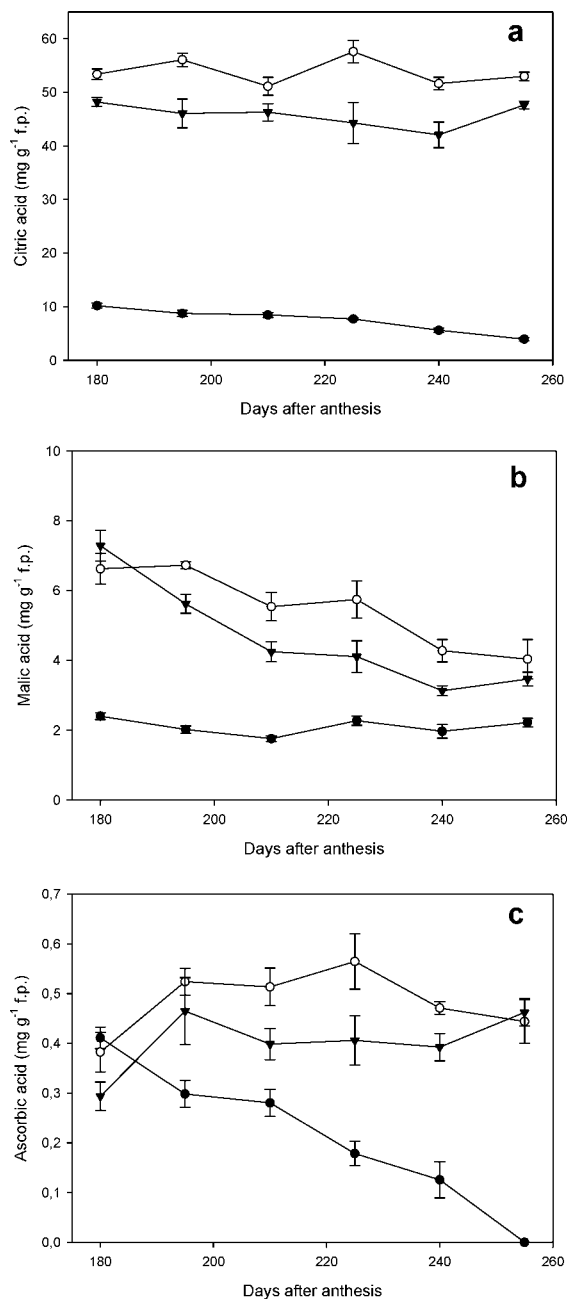
Statistical Analysis. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, Inc., 1989) to analyze the quantitative differences between the three genotypes.

RESULTS

Genetic Characterization. Flow cytometry analysis showed that WLM + EUR is diploid ($2n = 18$). Molecular markers were chosen to display polymorphism between the parents and consequently allowed us to identify the genomic origin of our cybrid. Analysis of nuclear DNA by 26 SSR markers revealed that the cybrid only possessed bands from Eureka lemon (**Figure 1A**). No recombination or deletion was observed. Chloroplast SSR enabled the two parents to be clearly distinguished and revealed that WLM + EUR conserved the chloroplast from Eureka lemon (**Figure 1B**). Mitochondria markers showed that the cybrid had bands from Willow leaf (**Figure 1C**). The cybrid combined the nucleus and chloroplasts from Eureka lemon with mitochondria from Willow leaf mandarin.

Titrateable Acidity. Titrateable acidity was analyzed during the mature stage (180–260 DAA). The cybrid and Eureka lemon had the most acidic fruits, and the titrateable acidity remained constant during this period with an average of 0.94 and 0.80 $\text{meq g}^{-1}\text{ fp}$, respectively. The cybrid was slightly more acidic than Eureka lemon. Willow leaf was less acidic, with an average of 0.11 $\text{meq g}^{-1}\text{ fp}$.

Organic Acid Contents at the Mature Fruit Stage. Seven organic acids were detected and identified in pulp of the three genotypes. The dominant acid was citric acid, representing an average of 89.86% of the total organic acids for Eureka lemon, 89.73% for the cybrid, and 72.27% for Willow leaf mandarin. Malic acid was the second highest, with an average of 18% of the total organic acids in Willow leaf and 9% in Eureka lemon



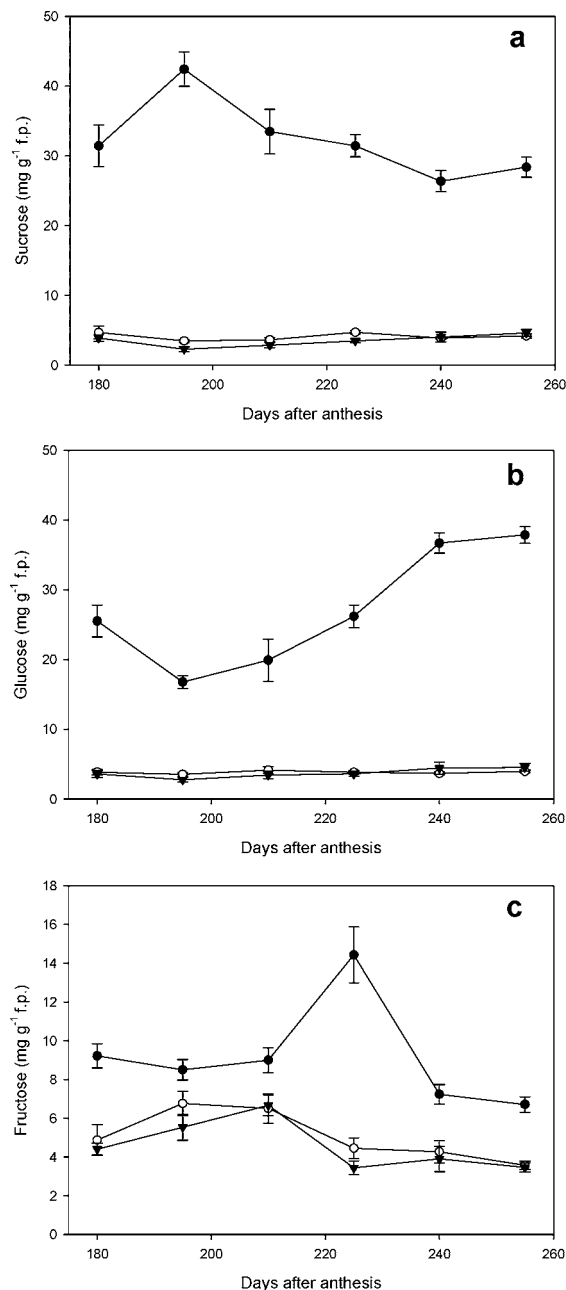
● Willow leaf ○ WLM + EUR ▼ E. Lemon

Figure 2. Organic acid levels in fruit pulp during the mature stage of Willow leaf mandarin (●), WLM + EUR (○), and Eureka lemon (▲). Each point on the graph shows the mean and standard error of three biological replicates.

and the cybrid. Other acids, such as oxalic, ascorbic, succinic, tartaric, and quinic acid, were present in very low amounts compared to the two dominant acids.

Citric acid contents in the cybrid and Eureka lemon were constant throughout the mature stage, whereas it decreased in Willow leaf mandarin. The cybrid displayed the highest amounts of citric acid, 53 mg g⁻¹ fp on average, still close to its lemon parent, 45 mg g⁻¹ fp on average (Figure 2a). Willow leaf had very low amounts of citric acid, 7 mg g⁻¹ fp on average.

The amounts of malic acid decreased gradually from 180 to 260 DAA in Eureka lemon and the cybrid but remained relatively constant in Willow leaf mandarin (Figure 2b). The



● Willow leaf ○ WLM + EUR ▼ E. Lemon

Figure 3. Sugar levels in fruit pulp during the mature stage of Willow leaf mandarin (●), WLM + EUR (○), and Eureka lemon (▲). Each point on the graph shows the mean and standard error of three biological replicates.

cybrid displayed the highest amounts of malic acid (5.48 mg g⁻¹ fp) followed by Eureka lemon (4.63 mg g⁻¹ fp) and Willow leaf (2.10 mg g⁻¹ fp). The amounts of ascorbic acid in fruits of Willow leaf mandarin decreased gradually from 0.41 mg g⁻¹ fp and reached 0 mg g⁻¹ fp at 260 DAA. The cybrid and Eureka lemon displayed the same changing pattern with a constant level of ascorbic acid, 0.48 and 0.40 mg g⁻¹ fp, respectively (Figure 2c).

Sugar Contents at Fruit Maturity. Three major sugars (sucrose, glucose, and fructose) were identified in pulp of the three genotypes. Willow leaf mandarin presented fruits with much higher sugar contents than Eureka lemon and WLM + EUR (Figure 3). The concentration of sucrose in fruit pulp of Willow leaf mandarin decreased with maturity from 42.43 to

Table 1. Carotenoid Contents (mg/L)^a

genotypes	phytoene	phytofluene	β -carotene	β -cryptoxanthin	lutein	zeaxanthin	violaxanthin
Willow leaf	1.62 \pm 0.13	2.78 \pm 0.21	1.47 \pm 0.12 a	17.66 \pm 1.15 a	0.96 \pm 0.05	1.29 \pm 0.03	3.74 \pm 0.15
WLM + EUR			0.07 \pm 0.01 b	0.20 \pm 0.01 b			
Eureka lemon			0.11 \pm 0.01 b	0.34 \pm 0.02 b			

^a Different letters in the same column indicate significant differences in carotenoid contents ($\alpha = 0.05\%$).

28.37 mg g⁻¹ fp, whereas in WLM + EUR and Eureka lemon, it remained relatively constant at 3 mg g⁻¹ fp (**Figure 3a**). Willow leaf mandarin showed an increase in glucose from 195 DAA (16.78 mg g⁻¹ fp) until the end (37.87 mg g⁻¹ fp), whereas WLM + EUR and Eureka lemon shared low values (3 mg g⁻¹ fp) of glucose (**Figure 3b**). The difference in fructose in Willow Leaf and acid fruits was low compared to the differences in sucrose and glucose (**Figure 3c**).

Carotenoid Composition and Concentration. Seven carotenoids were isolated and quantified in the pulp (**Table 1**). Willow leaf mandarin was characterized by a complex carotenoid composition. Xanthophylls were predominant and β -cryptoxanthin, violaxanthin zeaxanthin, and lutein accounted for 80% of the total carotenoid content. Linear carotenes were also detected, such as phytoene (1.62 \pm 0.13 mg L⁻¹) and phytofluene (2.78 \pm 0.21 mg L⁻¹). The mandarin parent accumulated large amounts of carotenoid and very large quantities of β -cryptoxanthin (17.66 \pm 1.15 mg L⁻¹). Conversely, in Eureka lemon and the cybrid, only very low concentrations of β -carotene and β -cryptoxanthin (β -carotene + β -cryptoxanthin \leq 0.5 mg L⁻¹) were detected. In addition, no significant quantitative difference was found between the cybrid and the lemon parent.

DISCUSSION

Genetic analyses revealed that the cybrid represents a lemon genome with Willow leaf mitochondria. This new genetic constitution may affect the composition of components involved in fruit quality because lemon and mandarin are different fruits. The parents displayed two different titratable acid profiles. Eureka lemon had an acid profile, while the profile of Willow leaf mandarin was less acidic. The values obtained for Eureka lemon (0.8 meq g⁻¹ fp) are in agreement with those generally reported in the literature for lemon varieties (35, 38). The cybrid had an enhanced lemon profile, with 0.94 meq g⁻¹ fp. Results suggest that the change from lemon mitochondria into mandarin mitochondria had an effect on acidity. In citrus juice, titratable acidity is known to be largely due to citric acid (35, 39), which is the major organic acid at the mature stage. In terms of amounts, WLM + EUR also displayed higher levels of citric acid than Eureka lemon (**Figure 2**). These results suggest that the cybrid improved the ability of Eureka lemon to produce high levels of citric acid. However, it is important to note that protoplast regenerated via somatic embryogenesis can induce genetic variation that may be responsible for minor phenotypic change (40). The citric acid cycle takes place in the matrix of the mitochondria of juice cells (41). We can thus suppose that the new mitochondria are the cause of the super production of organic acids in cybrid fruit pulp. It is interesting to note that the mitochondria originated from mandarin, which accumulates lower levels of organic acids. Mitochondria could play a machinery role, producing organic acids as a function of the glycolytic sugar substrate.

The concentration of ascorbic acid was seen to decrease in Willow leaf during the mature stage, as in the juice of oranges and grapefruit (42), whereas lemons undergo an increase in

ascorbic acid (43), which was conserved in the cybrid. It has previously been demonstrated that the ascorbic acid biosynthetic pathway is cytosolic except for the last step located on the inner mitochondrial membrane (44). The cybrid conserved cytosol from lemon, which explains why the cybrid accumulated ascorbic acid at maturity.

Lemons and mandarins display significant differences in their characteristic sugar storage patterns. Lemons contain little sugar and high amounts of organic acids (35), in contrast to mandarins, which contain high amounts of sugar and less organic acids. Sugars are synthesized in the cytosol. We observed that, similar to Eureka lemon, the cybrid had low sugar contents and high organic acid contents. This behavior can be explained by the presence of the lemon cytosol in the cybrid cells.

The two parents presented different carotenoid compositions (**Table 1**). Willow leaf mandarin was characterized by high amounts of xanthophylls and the massive accumulation of β -cryptoxanthin, whereas Eureka lemon was very poor in carotenoids. These results are in agreement with those of Fanciullino et al. (37) and Matsumoto et al. (45) on carotenoid compositions of mandarin and lemon varieties. In the works of these authors, mandarins were classified as violaxanthin- and β -cryptoxanthin-abundant or as violaxanthin-, phytoene-, and β -cryptoxanthin-abundant varieties, while lemons were classified as carotenoid-poor varieties. The cybrid, which inherited its nucleus and chloroplasts from the lemon parent, had a lemon carotenoid profile. This result was foreseeable because the cybrid fruits displayed the same pomological traits as those of Eureka lemon, particularly color. In addition, carotenoids are synthesized in plastids (chloroplasts or chromoplasts), and the enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway are nuclear-encoded (25, 26). Atienza et al. (46) underlined the importance of cytoplasm in determining endosperm carotenoid content in bread wheat. Our results showed that in citrus fruit, mitochondria do not affect carotenoid accumulation. Carotenoid accumulation is influenced by both the level of activity of the carotenoid biosynthetic genes and the presence of carotenoid-storing structures (47).

Our results suggest that the main genetic information for the biosynthesis of compounds involved in citrus fruit quality are contained in the nucleus and that the expression of these nuclear genes is not at all or only very slightly affected by interactions with the mitochondrial genome. Among carotenoid, sugar, and organic acid contents, only organic acids showed minor differences. The quantitative differences between the cybrid and the lemon parent with respect to organic acids could originate in a nucleo-cytoplasmic interaction. Gene expression patterns between several mitochondrial cybrids and their nucleus parent now need to be compared to test this hypothesis. From our results and the results of Fanciullino et al. (15), we conclude that cybridization should be used in citrus as a strategy to breed specific traits associated with mitochondrial genomes, such as male sterility, without affecting the main organoleptic and nutritional qualities.

LITERATURE CITED

- (1) Khan, I. A.; Kender, W. J. Citrus breeding: Introduction and objectives. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*; Khan, I. A., Ed.; Cabi Publishing: Oxfordshire, U.K., 2007; pp 1–8.
- (2) Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; Malfa, S. I.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1155–1166.
- (3) Ollitrault, P.; Luro, F. Citrus. In *Tropical Plant Breeding*; Charrier, A., Jacquot, M., Hamon, S., Nicolas D., Eds.; Science Publishers, Inc.: U.S.A., 2001; pp 55–77.
- (4) Spangenberg, G.; Freydl, E.; Osusky, M.; Nagel, J.; Potrykus, I. Organelle transfer by microfusion of defined protoplast–cytoplasm pairs. *Theor. Appl. Genet.* **1991**, *81*, 477–486.
- (5) Zubko, M. K.; Zubko, E. I.; Patskovsky, Y. V.; Khvedynich, O. A.; Fisahn, J.; Gleba, Y. Y.; Schieder, O. Novel “homeotic” CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, 1101–1110.
- (6) Guo, W. W.; Prasad, D.; Cheng, Y. J.; Serrano, P.; Deng, X. X.; Grosser, J. W. Targeted cybridization in citrus: Transfer of satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep.* **2004**, *22*, 752–758.
- (7) Li, Y. G.; Tanner, G. J.; Delves, A. C.; Larkin, P. J. Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, lucerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin). *Theor. Appl. Genet.* **1993**, *87*, 455–463.
- (8) Vardi, A.; Breiman, A.; Galun, E. Citrus cybrids: Production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor. Appl. Genet.* **1987**, *75*, 51–58.
- (9) Grosser, J. W.; Ollitrault, P.; Olivares-Fuster, O. Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant* **2000**, *36*, 434–449.
- (10) Olivares-Fuster, O.; Duran-Vila, N.; Navarro, L. Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Rep.* **2005**, *24*, 112–119.
- (11) Ollitrault, P.; Guo, W. W.; Grosser, J. W. Somatic hybridization. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*; Khan, I. A., Ed.; Cabi Publishing: Oxfordshire, U.K., 2007; pp 235–260.
- (12) Xu, X. Y.; Liu, J. H.; Deng, X. X. Isolation of cytoplasts from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplasm–protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **2006**, *25*, 533–539.
- (13) Cabasson, C. M.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Grosser, J. W. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **2001**, *20*, 604–609.
- (14) Moreira, C. D.; Chase, C. D.; Gmitter, F. G., Jr.; Grosser, J. W. Transmission of organelle genomes in citrus somatic hybrids. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **2000**, *61*, 165–168.
- (15) Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrt, P.; Remy, R.; Rousselle, P.; Renard, M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **1983**, *191*, 244–250.
- (16) Barsby, T. L.; Yarrow, S. A.; Kemble, R. J.; Grant, I. The transfer of cytoplasmic male sterility to winter-type oilseed rape (*Brassica napus* L.) by protoplast fusion. *Plant Sci.* **1987**, *53*, 243–248.
- (17) Thomzik, J. E.; Hain, R. Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* **1988**, *76*, 165–171.
- (18) Varotto, S.; Nenz, E.; Lucchin, M.; Parrini, P. Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102*, 950–956.
- (19) Pelletier, G.; Budar, F. The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 121–125.
- (20) Yarrow, S. A.; Burnett, L. A.; Wildeman, R. P.; Kemble, R. J. The transfer of “Polima” cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **1990**, *9*, 185–188.
- (21) Fitter, J. T.; Thomas, M. R.; Niu, C.; Rose, R. J. Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpeloid stamens. *J. Plant Physiol.* **2005**, *162*, 225–235.
- (22) Chang, C.; Uesugi, R.; Hondo, K.; Kakihara, F.; Kato, M. The effect of the cytoplasts of *Brassica napus* and *B. juncea* on some characteristics of *B. carinata*, including flower morphology. *Euphytica* **2007**, *158*, 261–270.
- (23) Fanciullino, A. L.; Gancel, A. L.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Brillouet, J. M. Effects of nucleocytoplasmic interactions on leaf volatile compounds from citrus somatic diploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4517–4523.
- (24) Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 210–218.
- (25) Gallagher, C. E.; Matthews, P. D.; Li, F. Q.; Wurtzel, E. T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1776–1783.
- (26) Taylor, M.; Ramsay, G. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: Recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant.* **2005**, *124*, 143–151.
- (27) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Carreel, F.; d’Hont, A.; Luro, F.; Bruyere, S.; Cabasson, C.; Lotfy, S.; Joumaa, A.; Vanel, F.; Maddi, F.; Treanton, K.; Grisoni, M. Somatic hybridization potential for citrus germplasm utilization. *Cahiers Agric.* **2000**, *9*, 223–236.
- (28) Mouhaya, W.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Ollitrault, P.; Luro, F.; Risterucci, A. M.; Morillon, R.; Froelicher, Y. Mitochondrial PCR markers reveal genetic diversity in *Citrus* and related genera. *Plant Cell Rep.*, manuscript submitted.
- (29) Cercos, M.; Soler, G.; Iglesias, D. J.; Gadea, J.; Forment, J.; Talon, M. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Mol. Biol.* **2006**, *62*, 513–527.
- (30) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Luro, F.; Duperray, C. Nuclear genome size variations in citrus. *Fruits* **1994**, *49*, 390–393, 475–476.
- (31) Froelicher, Y.; Dambier, D.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Lotfy, S.; Didout, C.; Beaumont, V.; Brottier, P.; Risterucci, A. M.; Luro, F.; Ollitrault, P. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Res.* **2008**, *8*, 119–122.
- (32) Cheng, Y.; Vicente, M. C. d.; Meng, H.; Guo, W.; Tao, N.; Deng, X. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol.* **2005**, *25*, 661–672.
- (33) Lotfy, S.; Luro, F.; Carreel, F.; Froelicher, Y.; Rist, D.; Ollitrault, P. Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2003**, *128*, 225–230.
- (34) Bain, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.* **1958**, *6*, 1–24.
- (35) Albertini, M. V.; Carcouet, E.; Pailly, O.; Gambotti, C.; Luro, F.; Berti, L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8335–8339.
- (36) Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M. J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140–2145.
- (37) Fanciullino, A. L.; Dhuique-Mayer, C.; Luro, F.; Casanova, J.; Morillon, R.; Ollitrault, P. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4397–4406.
- (38) Sadka, A.; Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K. B. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol. Plant.* **2000**, *108*, 255–262.
- (39) Rasmussen, G. K. Seasonal changes in organic acid content of Valencia orange fruit in Florida. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1963**, *84*, 181–187.
- (40) Orbovic, V.; Calovic, M.; Vilorio, Z.; Nielsen, B.; Gmitter, F. G., Jr.; Castle, W. S.; Grosser, J. W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* **2008**, *161*, 329–335.

- (41) Tucker, G. A. Introduction. In *Biochemistry of Fruit Ripening*; Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G., Eds.; Chapman and Hall: London, U.K., 1993; pp 1–37.
- (42) Robertson, G. L.; Nisperos, M. O. Changes in the chemical constituents of New Zealand grapefruit during maturation. *Food Chem.* **1983**, *11*, 167–174.
- (43) Bartholomew, E. T.; Sinclair, W. B. *The Lemon Fruit: Its Composition, Physiology, and Products*; University of California Press: Berkeley, CA, 1951; p 163.
- (44) Smirnoff, N. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20003, 229–235.
- (45) Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Kato, M.; Kuniga, T.; Nakajima, N.; Yoshida, T. Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC–MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2356–2368.
- (46) Atienza, S. G.; Martin, A.; Pecchioni, N.; Platani, C.; Cattivelli, L. The nuclear–cytoplasmic interaction controls carotenoid content in wheat. *Euphytica* **2008**, *159*, 325–331.
- (47) Howitt, C. A.; Pogson, B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell Environ.* **2006**, *29*, 435–445.

Received for review April 18, 2008. Revised manuscript received July 11, 2008. Accepted July 21, 2008. We thank the Collectivité Territoriale de Corse for granting this study.

JF801233M

III.4. ANALYSE COMPARATIVE DU TRANSCRIPTOME DU CYBRIDE ET DU CITRONNIER

III.4.1. Introduction

Les observations précédentes ont montré que la présence des mitochondries du mandarinier a une très faible influence sur les caractères phénotypiques du cybride. Pour obtenir un aperçu des effets moléculaires associés à la nouvelle interaction nucléo-mitochondriale, nous avons analysé à l'aide des microarrays développés dans le cadre du projet de génomique fonctionnelle des agrumes (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>), la variation de l'expression globale des gènes entre WLM + EUR 2x et le citronnier Eureka.

Les microarrays représentent un outil puissant pour l'étude de l'expression d'un très grand nombre de gènes et la comparaison de différentes situations biologiques (Aharoni et Vorst, 2002). En effet, comparée aux autres techniques d'étude de l'expression des gènes (Northern blot, RT-PCR), les microarrays permettent de travailler à plus grande échelle en favorisant une analyse simultanée de l'ensemble des transcrits d'un génome. Cette technique a été largement utilisée ces dernières années chez plusieurs espèces végétales dans le but de déterminer et de comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques mis en jeu lors de divers processus biologiques tels que les interactions plantes-pathogènes (Gandia *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2002), le développement et la maturation des fruits (Cercos *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2007), les interactions nucléo-cytoplasmiques (Carlsson *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008).

Le principe consiste à obtenir les ARNm des individus témoins et testés lors du processus biologique à étudier. Ces ARN marqués par fluorescence sont hybridés aux fragments d'ADN, représentatifs des différents gènes du microarray, fixés sur un support solide (membrane nylon ou lame de verre). L'intensité de la fluorescence mesurée suite à l'hybridation est proportionnelle à la quantité d'ARNm correspondante. Les analyses statistiques permettent d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les différents individus.

Pour cette étude, nous avons utilisé les ADNc obtenus à partir d'ARN extraits sur les feuilles matures du citronnier et du cybride, pour hybrider des microarrays contenant 21081 unigenes d'agrumes (Martinez-Godoy *et al.*, 2008). L'observation de l'expression globale de ces gènes, nous a permis d'évaluer l'influence de la substitution des mitochondries de citronnier par celles de mandarinier sur l'expression génomique.

III.4.2. Résultats

Afin d'identifier les différences d'expression des gènes entre le citronnier Eureka et le cybride, leurs ARNa extraits de feuilles matures et marqués respectivement des fluorochromes Cy3 et Cy5, sont hybridés aux cDNA correspondant aux 21081 unigenes présents sur les lames microarray. Après le lavage, les lames sont scannées à 532 nm pour le fluorochrome Cy3 (vert) et 635 nm pour le Cy5 (rouge), avec un scanner GenePix 4000B (Axon Molecular Devices), à une résolution de 10 nm et 100 % de puissance du laser (Figure 19). La normalisation des données est effectuée par régression linéaire LOWESS avec le programme Acuity (Molecular Devices). 15694 gènes (soit 74,4 % des gènes du microarray) sont retenus pour l'analyse SAM ("significance analysis of microarrays") des profils d'expression entre le citronnier Eureka et WLM + EUR 2x.

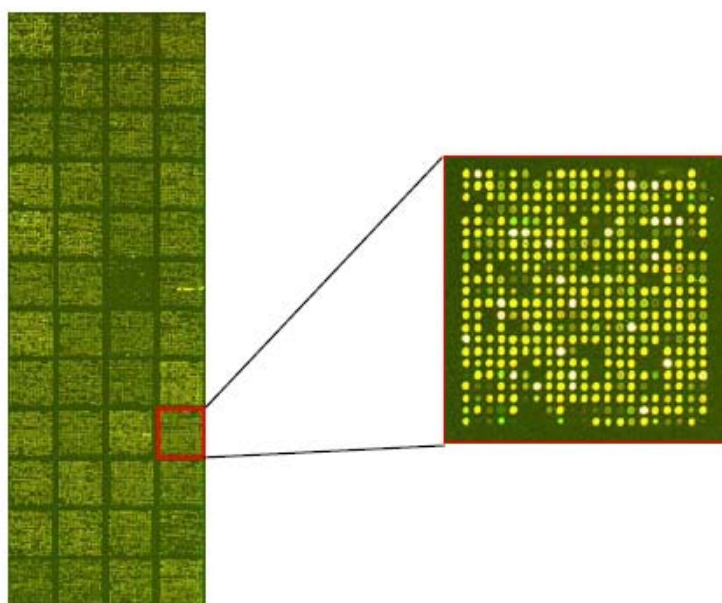


Figure 19: Scan de lame cDNA microarray 20 K *Citrus*

III.4.2.1. Différences transcriptionnelles entre le citronnier Eureka et WLM + EUR 2x

L'analyse SAM a révélé 519 (~ 2,5 %) gènes présentant des différences significatives d'expressions à une FDR ("false discovery rate") de 1,7%. Parmi les 519 gènes différenciellement exprimés, 480 sont surexprimés chez le cybride comparé au citronnier tandis que les 39 autres sont réprimés (Tableau 13 et 14 annexes). Afin de caractériser les

gènes différentiellement exprimés, nous avons déterminé leur appartenance aux différentes catégories fonctionnelles à l'aide des annotations de "Gene Ontology" (GO). A chaque unigène de citrus présent sur la lame microarray est attribué le code AGI d'un gène d'*Arabidopsis* avec lequel il présente une forte similarité de séquence. Ces codes sont utilisés par le programme Blast2go pour déterminer à quelle catégorie fonctionnelle GO appartiennent les gènes différentiellement exprimés. Sur les 519 gènes modulés, 87 ne présentent pas de similarité significative avec des codes AGI. Le reste des gènes est classé dans des catégories fonctionnelles très variées.

III.4.2.2. Classification fonctionnelle des gènes surexprimés chez le cybride

La figure 20 représente la répartition en catégories fonctionnelles des 408 gènes avec correspondance AGI surexprimés chez le cybride comparé au citronnier, un gène pouvant être représenté dans plusieurs catégories fonctionnelles.

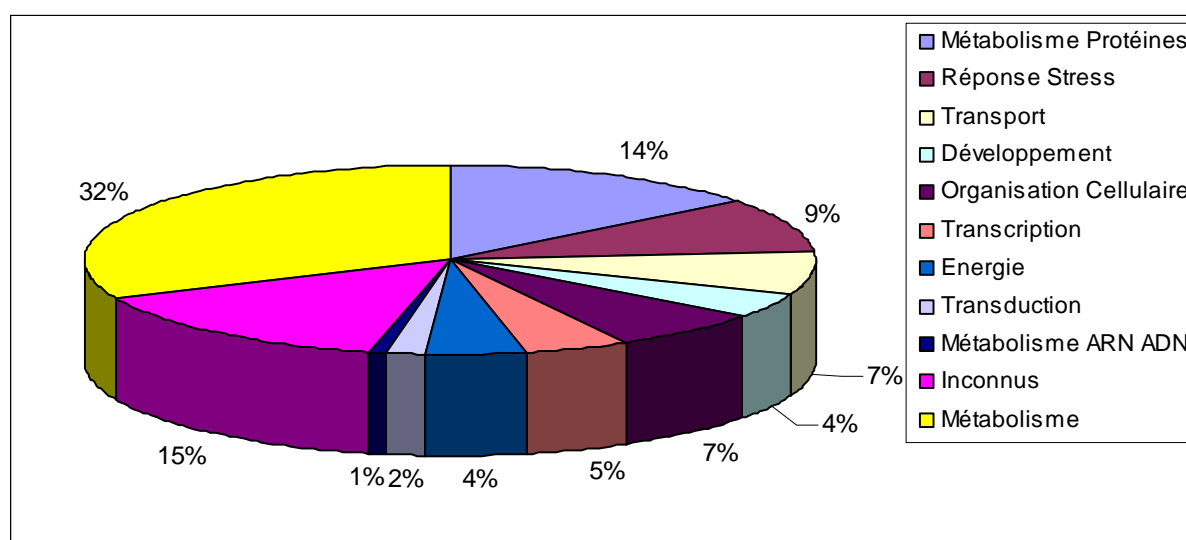


Figure 20: Distribution en catégories fonctionnelles des gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x.

Parmi les gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x, 15 % sont de fonctions inconnues. Les 2 catégories fonctionnelles les plus représentées correspondent aux gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme (32%) et le métabolisme protéique (14%). Les catégories fonctionnelles correspondant aux gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la "réponse au stress" (9 %), le "transport" (7 %), l'"organisation cellulaire" (7 %), le "développement" (4 %), la "transcription" (5 %) et l'"énergie" (4 %), sont moyennement représentées.



Figure 21: Visualisation des voies métaboliques affectés par l'altération de l'expression des gènes chez WLM + EUR 2x. Les colorations bleue et rouge indiquent les gènes affectés dans les voies métaboliques, respectivement de façon moyenne et très significative.

Très peu de gènes appartiennent aux fonctions transduction (2 %) et métabolisme des acides nucléiques (1 %).

La catégorie "métabolisme" regroupe un très large éventail de gènes avec un grand nombre d'entre eux qui se retrouvent également dans les autres catégories fonctionnelles. Pour mettre en évidence les voies métaboliques affectées par l'altération de l'expression des gènes chez WLM + EUR 2x, nous avons utilisé l'outil d'analyse AraCyc Omics Viewer (The Arabidopsis Information Resource [TAIR]; <http://www.arabidopsis.org/tools/aracyc>; (Mueller *et al.*, 2003)). Dans l'ensemble nous observons que diverses voies métaboliques sont affectées, notamment la voie métabolique des carbohydrates (glycolyse et gluconéogenèse), la photosynthèse (cycle de Calvin), la synthèse des acides organiques (voie du citrate), la voie du NAD/NADH phosphorylation et déphosphorylation, la voie du methylerythritol phosphate (MEP), la voie respiratoire avec des oxydases alternatives, la voie de l'ascorbate glutathion (Figure 21). La catégorie "métabolisme des protéines" est particulièrement représentée par des gènes qui codent pour des protéines ribosomales (40S et 60S). La catégorie "réponse au stress" regroupe entre autre des glutathion S-transférases, des SOD (superoxide dismutase) et ascorbate peroxydase. La catégorie fonctionnelle "Energie" présente des gènes intervenant dans la respiration et la photosynthèse (ATP synthase, des transporteurs d'électrons, des adenylate kinases, des protéines intervenant dans les photosystèmes I et II, et les chlorophylles a/b binding protéines) (Tableau 13 annexes). La catégorie fonctionnelle "transport" présente des gènes intervenants dans le transport, tels que les aquaporines, les protéines de transport, des transporteurs de potassium, d'ammonium et des sucres et une pompe à protons. En ce qui concerne les gènes classés dans la catégorie transcription, on retrouve beaucoup de facteurs de transcription et des protéines DNA et RNA binding.

L'analyse de la localisation cellulaire des protéines codées par les gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x, montre qu'elles ne sont pas préférentiellement de localisation mitochondriale.

III.4.2.3. Classification fonctionnelle des gènes réprimés chez le cybride

Parmi les 39 gènes réprimés chez WLM + EUR 2x, 24 présentent une correspondance AGI. Cinq gènes sur les 24 n'ont pas de fonctions connues (Tableau 14 annexes). Les catégories "métabolisme des protéines" (6 gènes) et "réponse au stress" (5 gènes) sont les plus représentées. Dans la catégorie "métabolisme des protéines", nous trouvons des gènes qui codent pour une protéine ribosomale mitochondriale, pour des protéases, pour une protéine kinase. Parmi les gènes de la catégorie "réponse au stress", nous trouvons différents gènes qui

interviennent dans la réponse aux ions cadmium, aux UV-B, au stress salin et aux chocs osmotiques. La catégorie fonctionnelle "métabolisme" est représentée par trois gènes qui interviennent dans la biosynthèse des lipides et acides gras. La catégorie "développement" regroupe deux gènes entrants respectivement dans le développement embryonnaire et la division cellulaire. La catégorie "transcription" compte également deux gènes qui interviennent dans la régulation de la transcription. La catégorie fonctionnelle "Energie" est faiblement représentée avec un seul gène qui code pour une protéase intervenant dans la réparation des sous-unités D1 du photosystème II. Aucun des gènes réprimés n'intervient dans le transport, la transduction, le métabolisme des acides nucléiques et l'organisation cellulaire. L'analyse en "gene enrichment" pour les processus biologiques, montre qu'aucune catégorie fonctionnelle n'est significativement surreprésentée parmi les gènes réprimés chez le cybride.

III.4.3. Discussion

L'analyse de l'expression des gènes à l'aide de cDNA microarrays a mis en évidence l'existence de modifications transcriptionnelles induites par la substitution de la mitochondrie du citronnier Eureka par celle du mandarinier Willow leaf. En effet, environ 2,5 % des 21081 gènes analysés montrent une altération de leurs profils d'expression chez WLM + EUR 2x comparé au parent citronnier. Ce résultat montre que la présence de la mitochondrie du mandarinier chez le cybride influence l'expression d'un certain nombre de gènes nucléaires du citronnier comme observé chez des alloplastes de *Gossypium hirsutum* (Zhang *et al.*, 2008) et *Brassica napus* (Carlsson *et al.*, 2007). L'information génétique des eucaryotes est répartie entre le génome nucléaire et le génome cytoplasmique représenté par les mitochondries et les chloroplastes (Atienza *et al.*, 2007). Les interactions entre ces génomes régissent le développement des plantes supérieures (Zubko *et al.*, 2001). La modification du génome mitochondrial par mutation ou par la formation de cybrides peut provoquer une modification de l'expression de certains gènes nucléaires (Carlsson *et al.*, 2008; Rhoads et Subbaiah, 2007; Zubko, 2004). Cette régulation de l'expression des gènes nucléaire par le génome mitochondrial appelé "retrograde signalling" (Butow et Avadhani, 2004; Liu et Butow, 2006; Rhoads et Subbaiah, 2007) permet aux organelles de coordonner leur fonctionnement avec le noyau (Rhoads et Subbaiah, 2007; Woodson et Chory, 2008). Ainsi, la nouvelle interaction entre la mitochondrie du mandarinier et le noyau du citronnier a provoqué une surexpression d'un grand nombre de gènes nucléaires (480 gènes) mais aussi la répression d'un nombre plus réduit d'autres gènes (39 gènes). La classification fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés montre que la majorité d'entre eux interviennent principalement dans le

métabolisme des protéines. Les analyses protéomiques et génomiques sur la localisation de séquences protéiques montrent que les organelles pourraient contenir jusqu'à plusieurs milliers de protéines différentes (Andersson *et al.*, 2003; Richly et Leister, 2004). Toutefois, la majorité de ces protéines (93-99 %) sont codées dans le noyau, synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans les organelles (Woodson et Chory, 2008). Ceci peut expliquer le fait que la nouvelle interaction nucléo-mitochondriale provoque une modification des profils d'expression des gènes nucléaires intervenants dans le métabolisme des protéines dans le but d'assurer le meilleur équilibre physiologique. Ainsi, certains gènes sont donc surexprimés pendant que d'autres sont réprimés en fonction de l'information reçue de la mitochondrie. Les gènes susceptibles d'intervenir dans la réponse au stress, sont également bien représentés parmi les gènes modulés. Il faut noter que dans cette catégorie fonctionnelle sont classés les gènes intervenant lors "d'une modification de l'état ou de l'activité d'une cellule et/ou organisme (en termes de production d'enzymes, d'expression de gènes, etc) à la suite d'une perturbation dans l'homéostasie des organismes et/ou des cellules, et pas nécessairement exogènes" (<http://amigo.geneontology.org/>). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la substitution cellulaire de la mitochondrie de citronnier par celle du mandarinier lors de l'hybridation somatique a pu créer une perturbation de l'équilibre cellulaire à l'origine des modifications de l'expression des gènes classés dans cette catégorie fonctionnelle. De plus, le contrôle mitochondrial de l'expression des gènes nucléaires ("retrograde signiling") chez les plantes est connu pour être impliqué dans la production des ROS (reactive oxygen species) et des HSP (heat shock proteins), la sensibilité aux stimuli liés aux agents pathogènes et la mort cellulaire programmée (Butow et Avadhani, 2004; Liu et Butow, 2006; Rhoads et Subbaiah, 2007). La réponse à ces dysfonctionnements passe alors par l'induction de gènes codant des protéines impliquées dans l'amélioration des fonctions mitochondriales, tels que des oxydases et NAD(P)H déshydrogénases alternatives, des gènes codant pour des enzymes destinées à réguler le niveau des ROS et/ou le niveau redox (glutathion transférases, catalases, ascorbate peroxydases, SOD) (Rhoads et Subbaiah, 2007; Woodson et Chory, 2008). Le profil général d'expression des gènes chez le cybride correspond à une régulation "retrograde signiling". En effet, en plus des gènes de la catégorie stress (glutathion S-transférases, SOD et ascorbate peroxydase), les gènes potentiellement impliqués dans la phosphorylation et la déphosphorylation, la chaîne respiratoire (cytochrome c, oxydases alternatives), la glycolyse et le cycle de Krebs, la voie de l'ascorbate glutathion sont également modulés chez WLM + EUR 2x. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une réponse nucléaire aux besoins de la nouvelle mitochondrie qui provient d'un cytoplasme bien

différent au niveau phylogénétique. Le mandarinier a un cytoplasme qui provient du taxon *C. reticulata* tandis que le cytoplasme du citronnier est de *C. maxima* (Froelicher *et al.*, Submitted; Nicolosi *et al.*, 2000), d'où la nécessité des régulations pour atteindre une nouvelle homéostasie.

La modification de la mitochondrie affecte l'ensemble des structures cellulaires chez WLM + EUR 2x. En effet, l'analyse de la localisation cellulaire des protéines codées par les gènes modulés montre qu'elles sont bien réparties au niveau cellulaire. Le cybride présente ainsi, une altération de l'expression des gènes intervenants dans le cycle de Calvin. Des observations similaires ont été faites par Matsuo *et al.* (2006) chez *Chlamydomonas reinhardtii* où l'activation de la voie respiratoire du cytochrome dans les mitochondries provoque une augmentation de l'expression de gènes nucléaires liés à la photosynthèse. Différentes études sur des mutants mitochondriaux et chloroplastiques ont mis en évidence le contrôle que peuvent avoir les mitochondries sur le fonctionnement des chloroplastes et vis versa, appelé "cross-talk" (Newton et Coe, 1986; Newton *et al.*, 2004; Priault *et al.*, 2006; Sabar *et al.*, 2000). Il est établi que dans les cellules végétales, les mitochondries et les chloroplastes ont des formes complexes d'interactions métaboliques. Les chloroplastes utilisent lors de la photosynthèse des produits mitochondriaux (CO_2 et ATP) et fournissent des composés pour la respiration mitochondriale (O_2 et malate) (Raghavendra et Padmasree, 2003). Toutefois il reste encore à déterminer les mécanismes du "cross-talk", à savoir s'il est direct entre organelles (métabolites, ROS) ou indirect en passant par le noyau (Woodson et Chory, 2008).

Cette étude montre que même si quasiment aucune modification phénotypique n'a été observée au niveau des feuilles du cybride comparées aux feuilles du citronnier (cf chapitre III. 2), nous observons quand même d'importantes modifications du transcriptome, toutes ces modifications étant probablement effectuées dans le but de permettre à la nouvelle construction cellulaire de pouvoir trouver une nouvelle homéostasie.

III.5. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE COMPAREE DE L'HYBRIDE ALLOTETRAPLOÏDE ET DE SES PARENTS

III.5.1. Introduction

L'exploitation de la polyploïdisation dans les programmes d'amélioration des agrumes, par l'hybridation somatique, participe à l'extension de la gamme variétale. En effet, l'hybridation somatique permet d'introgesser des gènes provenant de différentes espèces, sans être limité par l'incompatibilité sexuelle ou par la stérilité de certains génotypes (Grosser *et al.*, 1996b). Elle a ainsi permis de créer de nouveaux porte-greffes tétraploïdes en combinant des génomes de porte-greffes aux qualités agronomiques complémentaires. Pour les variétés, l'hybridation somatique a permis de diversifier le pool des géniteurs tétraploïdes utilisés pour la création de variétés triploïdes aspermes (Grosser *et al.*, 2000).

D'un point de vue théorique, la fusion de génomes distincts au sein d'un organisme doit aboutir à une addition des génomes de telle sorte que les paires de gènes dupliqués contribuent de façon égale au phénotype du nouvel organisme. Bien au contraire, les observations de polyploïdes ont permis de voir que de telles combinaisons donnent généralement naissance à de nouveaux phénotypes qui peuvent être intermédiaires ou complètement différents des parents (Osborn *et al.*, 2003). Ces nouveaux phénotypes, sont généralement le fruit de différentes régulations génétiques qui se mettent en place lors de la formation de ces hybrides (Chen, 2007; Comai *et al.*, 2000). Aujourd'hui, les études sur les hybrides polyploïdes établissent clairement que l'expression du transcriptome est très affectée par la polyploïdisation (Adams *et al.*, 2003; Chen, 2007; Feldman *et al.*, 1997; Lee et Chen, 2001). Les mécanismes moléculaires de l'élaboration du phénotype chez les hybrides somatiques restent toutefois très peu compris.

WLM + EUR 4x est un des hybrides allotétraploïdes obtenus par le CIRAD dans le cadre de son programme d'hybridation somatique. Cet hybride est une combinaison des génomes nucléaires du mandarinier Willow leaf et du citronnier Eureka plus la totalité du cytoplasme du mandarinier. Ces deux variétés sont très distinctes au niveau phénotypique. Notre objectif est donc d'évaluer chez l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x, les effets de l'interaction des génomes parentaux sur l'expression phénotypique des caractères liés aux feuilles, aux fleurs et aux fruits.

III.5.2. Résultats

III.5.2.1. Description des feuilles

La description des feuilles de l'hybride allotétraploïde et de ses parents est faite au mois d'août sur 30 feuilles de la pousse de printemps. Les observations et les mesures portant sur la forme du limbe, le type de bordure du limbe, la présence ou l'absence d'ailette, l'épaisseur moyenne des feuilles, la longueur moyenne du limbe, la largeur moyenne du limbe, la surface foliaire et le rapport moyen de la longueur sur sa largeur de la feuille, sont reportées dans le tableau 10.

Tableau 10: Caractères foliaires de l'hybride somatique comparés à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 4x	EUR
Longueur moyenne du limbe (cm)	8,21 ± 0,08 ^a	10,75 ± 0,09 ^b	11,81 ± 0,10 ^c
Largeur moyenne du limbe (cm)	2,26 ± 0,02 ^a	5,15 ± 0,05 ^b	5,12 ± 0,06 ^b
Rapport moyen L/l	3,64 ± 0,04 ^a	2,09 ± 0,02 ^b	2,32 ± 0,03 ^c
Surface foliaire du limbe (cm ²)	11,70 ± 0,21 ^a	36,06 ± 0,58 ^b	37,89 ± 0,69 ^b
Epaisseur moyenne du limbe (mm)	0,28 ± 0,01 ^a	0,35 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^b
Forme du limbe	Lancéolée	Elliptique	Elliptique
Bordure du limbe	Lisse	Ondulée	Ondulée

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative au seuil de 5 %

Comme nous l'avons déjà observé plus haut, le mandarinier et le citronnier, montrent une différenciation bien marquée pour les feuilles (Figure 22). En effet, le citronnier présente des feuilles longues, larges et épaisses avec une grande surface foliaire, à l'opposée du mandarinier qui a des feuilles lancéolées d'épaisseur moyenne, et une faible surface foliaire (Tableau 10).

L'hybride somatique allotétraploïde, présente des caractéristiques foliaires très proches de celles du citronnier (Tableau 10). En effet, WLM + EUR 4x présente des feuilles de forme elliptique et aussi épaisses que celles du citronnier, 0,35 mm pour WLM + EUR 4x et 0,37 mm pour le citronnier tandis que l'épaisseur est de seulement 0,28 mm chez le mandarinier. Les feuilles de l'hybride allotétraploïde sont moins longues que celle du citronnier, 10,75 cm et 11,81 cm respectivement, pour une largeur identique à celles du citronnier; ce qui se traduit par un rapport L/l plus faible que celui des parents (3,64 pour le mandarinier, 2,32 pour le citronnier, 2,09 pour l'hybride).



Figure 22: Morphologie des feuilles du mandarinier Willow leaf (droite), de l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x (centre), et du citronnier Eureka (gauche).

III.5.2.2. Description des fleurs

La description de 30 fleurs pour chacun des trois génotypes est consignée dans le tableau 11. La description a porté sur le type de fleurs, leur couleur externe et interne, la couleur des anthères, le diamètre du calice, la longueur des pétales, le nombre d'étamines, le nombre de pétales, la viabilité du pollen.

Les appareils floraux du mandarinier et du citronnier présentent des différences importantes. Le mandarinier possède de petites fleurs blanches avec un pollen ayant un fort taux de germination. En revanche, le citronnier présente de grandes fleurs anthocyanées avec un pollen ayant un très faible taux de germination.

Tableau 11: Caractères floraux de l'hybride somatique comparés à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 4x	EUR
Diamètre moyen de la fleur (mm)	4,8 ± 0,1 ^a	7,7 ± 0,17 ^b	7,1 ± 0,1 ^c
Longueur moyenne des pétales (mm)	12,3 ± 0,3 ^a	19,5 ± 0,37 ^b	19,2 ± 0,4 ^b
Nombre de pétales	7,3 ± 0,3 ^a	5 ± 1E-5 ^b	5,1 ± 0,1 ^b
Nombre d'étamines	13 ± 1 ^a	29 ± 1 ^b	36 ± 1 ^c
Taux de fleurs hermaphrodites (%)	100	50	26,7
Taux de fleurs mâles (%)	0	50	83,3
Taux de germination du pollen (%)	73,7 ± 5,2 ^a	9,0 ± 3,94 ^b	1,4 ± 0,5 ^b
Couleur externe de la fleur	Blanche	Anthocyane	Anthocyane
Couleur interne de la fleur	Blanche	Blanche	Blanche
Couleur des anthères	Jaune	Jaune	Jaune

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative au seuil de 5 %



Figure 23: Morphologie des fleurs du citronnier Eureka (gauche), de l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x (centre), et du mandarinier Willow leaf (droite).

L'hybride allotétraploïde présente un appareil floral intermédiaire aux deux parents avec toutefois des caractères proches de celui du citronnier (Tableau 11). En effet, les fleurs de WLM + EUR 4x ont un nombre de pétales identique à celui du citronnier (5), d'une longueur de pétales non significativement différente du citronnier (19,5 mm et 19,2 mm, respectivement). Le mandarinier possède un nombre moyen de pétales de 7 et une longueur moyenne de 12,3 mm, nettement plus petite que l'hybride somatique et le citronnier. La coloration externe anthocyane des fleurs de WLM + EUR 4x est plus proche de celle du citronnier. En revanche, l'hybride allotétraploïde se différencie de ses parents sur le nombre d'étamines (29 étamines) supérieur à celui du mandarinier (13 étamines) et inférieur à celui du citronnier (36 étamines), le taux de fleurs hermaphrodites (50 % contre 100 et 26,7 % respectivement) et mâles (50 % contre 0 et 83,3 % respectivement), le taux de germination du pollen (9 % contre 73,7 et 1,4 % respectivement). De même, les fleurs de WLM + EUR 4x montrent des pétales plus larges que ceux des deux parents (Figure 23).

III.5.2.3. Description des fruits

Le tableau 12 récapitule l'ensemble des observations et des mesures effectuées sur les fruits et les graines de WLM + EUR 4x et de ses parents.

Comme nous l'avons décrit plus haut, les fruits du citronnier sont à coloration jaune, de forme allongée, à peau épaisse avec une texture piquetée et de forte adhérence, donc difficile à éplucher. A l'opposé, les fruits du mandarinier sont jaunes orangés, de forme aplatie, avec une peau fine de texture papillée et facile à éplucher.

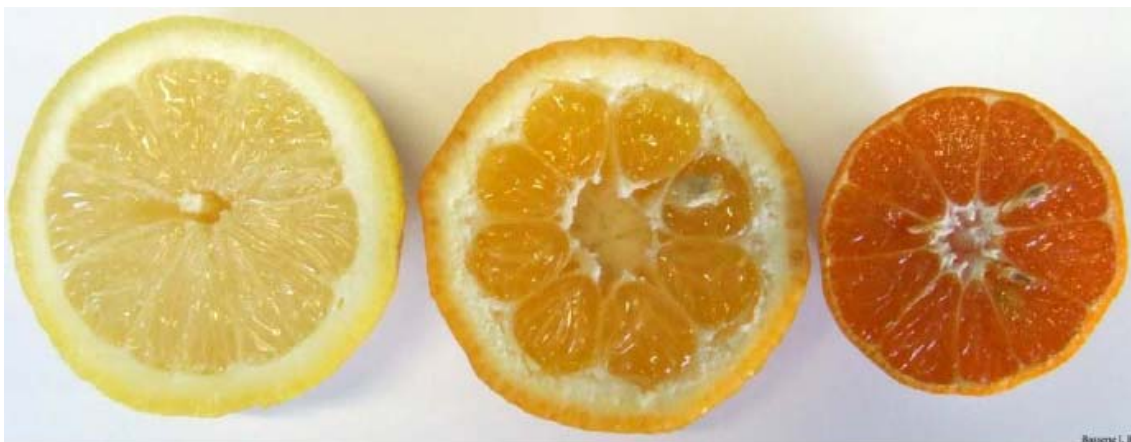


Figure 24: Coupe transversale des fruits du citronnier Eureka (gauche), de l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x (centre), et du mandarinier Willow leaf (droite).

Tableau 12: Caractéristiques des fruits de l'hybride somatique comparées à ses parents

	Willow leaf	WLM + EUR 4x	EUR
Poids moyen du fruit (g)	60,3 ± 3,5 ^a	128,8 ± 7,2 ^b	224,7 ± 10,7 ^c
Diamètre moyen du fruit (mm)	53,6 ± 0,8 ^a	71,2 ± 1,6 ^b	71,1 ± 1,4 ^b
Longueur moyenne du fruit (mm)	39,9 ± 1,6 ^a	54,1 ± 1,2 ^b	98,6 ± 4,2 ^c
Epaisseur de la peau (mm)	3,3 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,15 ^b	7,8 ± 0,3 ^c
Diamètre de l'axe du fruit (mm)	14,6 ± 1,1 ^a	21,2 ± 1,1 ^b	10,6 ± 0,9 ^c
Nombre de segments par fruit	11 ± 0,3 ^a	9 ± 0,4 ^b	9 ± 0,4 ^b
Nombre de graines par fruit	15 ± 2 ^a	8 ± 0,91 ^b	2 ± 1 ^c
Nombre moyen d'embryons par graine	4 ± 0,2 ^a	3 ± 0,55 ^{ab}	2 ± 0,4 ^b
° Brix	9,5 ± 1E-8 ^a	6,5 ± 0,05 ^b	5,4 ± 0,03 ^c
Acidité titrable	0,07 ± 5E-3 ^a	0,47 ± 2E-3 ^b	0,82 ± 0,01 ^c
Forme du fruit	Aplatie	Aplatie	Ellipsoïde
Forme de la base du fruit	Concave	Concave	Convexe
Forme de l'apex du fruit	Déprimée	Déprimée	Mammiforme
Texture de la surface du fruit	Papillée	Papillée	Piquetée
Couleur de la peau du fruit	Jaune orangé	Jaune orangé	Jaune
Extrémité du style du fruit	Fermée	Fermée	Fermée
Nature des glandes à huiles	Voyantes	Voyantes	Voyantes
Adhérence de la peau	Faible	Faible	Forte
Nature de la peau des segments	Fragile	Résistante	Résistante
Adhérence des segments entre eux	Très faible	Moyenne	Moyenne
Couleur de la pulpe	Orange	Jaune orangé	Jaune clair
Taille des vésicules	Moyenne	Moyenne	Moyenne
Forme des vésicules	Moyenne	Moyenne	Etroite
Couleur du mésocarpe	Jaune orangé	Blanc	Blanc
Axe du fruit	Creux	Creux	Semi-creux
Forme de l'axe	Irrégulier	Irrégulier	Régulier
Forme des graines	Deltoïde	Sphéroïde	Ovoïde
Texture de la surface de la graine	Lisse	Lisse	Lisse
Couleur de la surface de la graine	Crème	Crème	Crème
Couleur des cotylédons	Vert clair	Vert clair	Ivoire
Couleur de la chalaze	Pourpre	Pourpre	Pourpre

Les valeurs expriment, la moyenne ± erreur standard; les différentes lettres d'une même ligne, montrent une différence significative au seuil de 5 %

Les caractéristiques externes des fruits de l'hybride allotétraploïde sont plus proches de ceux des fruits du mandarinier que du citronnier (Figure 24). En effet, les fruits de WLM + EUR 4x sont des fruits aplatis avec une base concave et un apex déprimé comme ceux du

mandarinier. De même, ils ont une peau de texture papillée et de coloration jaune orangé comme les fruits du mandarinier. D'autres caractères non quantitatifs sont communs au mandarinier et à l'hybride allotétraploïde, comme l'adhérence de la peau, la forme des vésicules, la forme de l'axe du fruit. Toutefois, on observe que dans l'ensemble, les fruits de l'hybride allotétraploïde ont des caractéristiques intermédiaires au citronnier et au mandarinier. Le poids moyen des fruits de WLM + EUR 4x est de 128,8 g, supérieur à celui des fruits du mandarinier (60,3 g), mais en dessous de ceux du citronnier (224, 7 g). Il en est de même, de la longueur des fruits, 39,9 mm pour le mandarinier, 54,1 mm pour WLM + EUR 4x et 98,6 mm pour le citronnier. Les caractères tels que, l'épaisseur de la peau, le nombre de graines, le nombre d'embryons par graine, le degré brix et l'acidité titrable, suivent également la même tendance (Tableau 12). Cependant, quelques caractères du citronnier sont également conservés chez l'hybride somatique tels que le diamètre du fruit, le nombre de segments, la nature de la peau des segments, l'adhérence des segments entre eux et la couleur du mésocarpe (Tableau 12).

III.5.2.4. Classification hiérarchique

Nous avons utilisé les données morphologiques quantitatives pour réaliser une classification hiérarchique des trois génotypes par mesure des distances euclidiennes sur les valeurs non centrée-réduites avec la méthode Ward (Figure 25). Cette représentation montre que l'hybride allotétraploïde est plus proche au niveau morphologique du parent citronnier que du parent mandarinier.

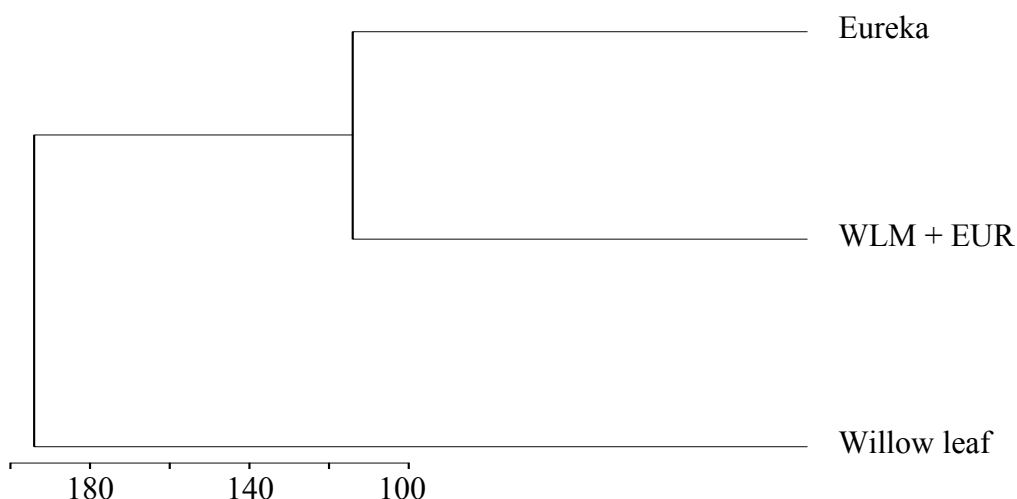


Figure 25: Dendrogramme obtenu à partir des distances Euclidiennes des données morphologiques quantitatives des feuilles, des fleurs et des fruits du citronnier Eureka, de l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x et du mandarinier Willow leaf.

III.5.3. Discussion

Les deux parents ont des morphologies de feuilles, de fleurs et de fruits qui se différencient fortement. En revanche, l'hybride somatique allotétraploïde présente dans l'ensemble plusieurs caractéristiques phénotypiques intermédiaires aux parents (longueur du limbe, diamètre de la fleur, nombre d'étamines, longueur du fruit, nombre de graines). Ces caractéristiques phénotypiques intermédiaires aux géniteurs sont souvent observées chez les hybrides somatiques allotétraploïdes (Collonnier *et al.*, 2003; Fock *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2002) et notamment chez les agrumes (Grosser *et al.*, 1996b; Grosser *et al.*, 2007; Khan et Grosser, 2004; Ling et Iwamasa, 1994; Ohgawara *et al.*, 1991). Ainsi, la morphologie des feuilles, des fleurs et d'autres organes sert généralement de marqueur pour l'identification des hybrides (Grosser et Gmitter, 1990; Zhou *et al.*, 2001). Les caractères morphologiques de WLM + EUR 4x, intermédiaires à ceux du citronnier et du mandarinier, témoignent d'une coexpression des génomes du mandarinier et du citronnier. En effet, les hybrides polyploïdes peuvent donner naissance à des phénotypes intermédiaires aux deux parents mais également à de nouveaux phénotypes au delà de la contribution des parents, suggérant respectivement une expression additive et non additive des gènes (Chen, 2007). Dans l'ensemble, certains caractères morphologiques affichés par WLM + EUR 4x suggèrent une expression additive des gènes. Toutefois, nous avons observé des phénomènes de dominances, de l'un ou l'autre des parents, pour un certain nombre d'autres caractères, avec dans l'ensemble une dominance plus marquée des caractères du citronnier.

Le phénotype des feuilles et des fleurs de WLM + EUR 4x est plus proche du citronnier que du mandarinier. En effet, l'hybride somatique allotétraploïde présente de fortes similarités avec le citronnier pour des caractères tels que, la forme et la largeur du limbe, l'épaisseur de la feuille, la surface foliaire, le nombre et la longueur des pétales, le pourcentage de germination du pollen et la coloration de la fleur (Tableau 10 et 11). En revanche, aucun caractère phénotypique des feuilles et des fleurs de mandarinier ne sont apparu dominants. La dominance de l'un ou de l'autre parent en fonction des caractères est également observée chez des hybrides de *Solanum* et de *Nicotiana*. Menke *et al.* (1996) ont observé chez les hybrides allotétraploïdes entre *Solanum pinnatisectum* et *S. tuberosum* des tubercules très similaires à ceux de *S. tuberosum* à l'inverse de la morphologie des feuilles, intermédiaire aux deux parents. De même, Sun *et al.* (2007) ont observés que les hybrides allotétraploïdes entre *Nicotiana glauca* et *N. tabacum* ont des fleurs similaires à celles de *N. tabacum*.

La morphologie des fruits de WLM + EUR 4x est elle légèrement proche de celle du mandarinier que par celui du citronnier. La forme et la coloration des fruits de l'hybride allotétraploïde sont visuellement identiques à celles des fruits du mandarinier (Figure 24), alors que plusieurs des caractères étudiés sont intermédiaires. En effet, certains des caractères observés chez les fruits de l'hybride allotétraploïde tels que, le nombre d'embryons par graine, le poids des fruits, la longueur des fruits, le nombre de graines, ... (Tableau 12) suggèrent une hérédité additive.

WLM + EUR 4x présente des fleurs avec des pétales plus larges comparées aux parents (Figure 23). Cette différence d'envergure peut être attribuée à l'effet de la tétraploïdie *per se*. En effet, une des conséquences de la polyploïdisation est l'augmentation du volume cellulaire (Cavalier-Smith, 1978), qui se traduit par la formation d'organes végétatifs et reproductifs plus volumineux comparés aux diploïdes (Otto et Whitton, 2000). Cette augmentation du volume cellulaire chez les tétraploïdes pourrait également expliquer que l'hybride allotétraploïde produit des fruits de même diamètre que ceux du citronnier alors que la majorité des autres caractéristiques morphologiques du fruit semble hérités de manière additive.

Le dendrogramme obtenu à partir de la matrice de dissimilarité (distance euclidienne) des caractères phénotypiques quantitatifs montre une dominance des caractéristiques morphologique du citronnier sur le mandarinier pour l'élaboration du phénotype de l'hybride somatique. En effet, WLM + EUR 4x est groupé avec le citronnier et se différencie plus du mandarinier (Figure 25). Une dominance morphologique de *Arabidopsis arenosa* sur *A. thaliana* est également observée chez leurs hybrides allotétraploïdes (Wang *et al.*, 2006). La plupart des hybrides ont des caractéristiques morphologiques similaires à *A. arenosa* tels que, de longues feuilles, beaucoup de branches et des fleurs de coloration rose. Nos observations morphologiques mettent donc en évidence, une hérédité non additive de nombreuses caractéristiques phénotypiques des feuilles, des fleurs et des fruits de l'hybride somatique allotétraploïde.

III.6. TRANSMISSION DE CARACTERES IMPLIQUES DANS LA QUALITE DU FRUIT CHEZ UN HYBRIDE SOMATIQUE INTERSPECIFIQUE D'AGRUMES

III.6.1. Résumé de l'article

Introduction

La création de parents allotétraploïdes par hybridation somatique est aujourd'hui partie intégrante des programmes d'amélioration ayant pour objectif la création de cultivars triploïdes aspermes. Ils constituent par ailleurs un modèle intéressant pour l'analyse de l'hérédité des caractères chez les allopolyploïdes. Les principaux composés de la qualité des fruits d'agrumes, tels que les acides organiques, les sucres et les composés aromatiques, sont étudiés sur les fruits d'un hybride somatique allotétraploïde entre le mandarinier Willow leaf (*Citrus deliciosa* Ten.) et le citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm.) ainsi que les fruits des deux parents diploïdes. L'objectif de cette étude est de déterminer les effets de la coexistence des deux génomes nucléaires parentaux sur la biosynthèse des composés de la qualité des fruits.

Matériel et méthodes

Les génomes nucléaires et cytoplasmiques ont été étudiés par des analyses moléculaires avec des SSR nucléaires et chloroplastiques ainsi que des marqueurs PCR mitochondriaux, et le niveau de ploïdie confirmé par cytométrie en flux et comptage chromosomique.

Les teneurs en sucres et en acides organiques sont quantifiées dans la pulpe des fruits au cours de leur période de maturation par HPLC. De même, la composition chimique des huiles essentielles du zeste des fruits est déterminée par chromatographie GC, GC / MS et RMN ¹³C.

Résultats

La caractérisation moléculaire de l'hybride somatique, nommé WLM + EUR 4x, montre qu'il combine les génomes nucléaires des deux parents, avec les mitochondries et les chloroplastes du mandarinier. L'hybride somatique montre un profil très proche du parent citronnier pour la synthèse des acides organiques, et proche du parent mandarinier pour les teneurs en fructose. Les concentrations en saccharose et en glucose de la pulpe des fruits de WLM + EUR 4x sont intermédiaires aux deux parents. La composition aromatique du zeste des fruits de WLM + EUR 4x est plus proche de celle des fruits du mandarinier avec toutefois un effet non négligeable du parent citronnier. En effet, les teneurs en N-méthyl

methylantranilate (composé spécifique au mandarinier) sont très faibles chez WLM + EUR 4x. Nos résultats nous amènent à conclure que la biosynthèse des composés impliqués dans la qualité des fruits d'agrumes n'est pas héritée de manière additive chez l'hybride allotétraploïde. Selon les composés considérés, les caractères du mandarinier ou du citronnier peuvent être dominants.

III.6.2. Article

Titre: Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid

BASSENE, J. B.; BERTI, L.; COSTANTINO, G.; CARCOUET, E.; KAMIRI, M.; TOMI, F.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; FROELICHER, Y.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. Article soumis.

Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid

JEAN-BAPTISTE BASSENE, [†] LILIANE BERTI, [‡] GILLES COSTANTINO, [§] ELODIE CARCOUET, [§] MOURAD KAMIRI, [†] FELIX TOMI, [‡] DOMINIQUE DAMBIER, [‡] PATRICK OLLITRAULT, [†] AND YANN FROELICHER ^{†}*

CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), UPR Multiplication végétative, F-20230 San Giuliano, France ; Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France; INRA (Institut National de Recherche Agronomique), UR GEQA, San Giuliano, F-20230 San Giuliano, France.

RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)

[†] CIRAD UPR Multiplication végétative.

[‡] Université de Corse, Laboratoire Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal.

[§] INRA unité GEQA.

^{*} Author to whom correspondence should be addressed (telephone +33(0)495595911; fax + 33(0)495595937; e-mail froelicher@cirad.fr).

ABSTRACT

The main components of citrus fruit quality (organic acids, sugars and aromatic compounds) were studied in fruits of a somatic hybrid allotetraploid between Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) + Eureka lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) and the two diploid parents. The somatic hybrid (WLM + EUR) combined both nuclear genomes of the parents, with chloroplasts and mitochondria of mandarin. Variations in sugar and acid content were studied in fruit pulp during the maturing period, and the chemical composition of peel oils was investigated by capillary GC, GC/MS and ¹³C NMR. The somatic hybrid was close to the lemon parent in the synthesis of organic acids, and close to the mandarin parent in fructose content, while sucrose and glucose content lay between the two parents. The aromatic compounds of WLM + EUR were close to mandarin with a non-negligible effect of lemon, which inhibits the methyl N-methylanthranilate, a mandarin-specific compound. Our results lead us to conclude that biosynthesis of compounds involved in citrus fruit quality is not inherited in an additive way in the allotetraploid hybrid. We observed mandarin dominance for fructose and most of the aromatic compounds, lemon dominance for organic acid and methyl N-methylanthranilate, and codominance for sucrose and glucose.

KEYWORDS: *Citrus* Somatic Hybrid, allotetraploid, Sugars, Organic acids, Essential oil, Fruit Quality

INTRODUCTION

Somatic hybridization by protoplast fusion has been used in citrus breeding for the last two decades (1). Interspecific and intergeneric hybridizations have produced many allotetraploid hybrids. These tetraploid lines are useful for breeders for the production of seedless varieties which is a key commercial objective in citrus improvement programmes driven by consumer preferences (2, 3). Together with diploid cultivars, they serve as breeding parents for the production of citrus triploid seedless genotypes (2, 4-6). Somatic hybridization has resulted in great diversification of the tetraploid gene pool available for sexual hybridization with diploid cultivars, and thousands of triploids have been produced from interploid crosses using somatic hybrid parents (6).

Somatic hybridization enables the whole nuclear genomes of two genotypes to be added whatever their heterozygosity. It is thus an original tool for analyzing the rules of phenotypic inheritance in citrus. At international level, evaluations are ongoing for several interspecific and intergeneric hybrids with the aim of understanding the inheritance mechanisms in allopolyploid citrus genomes. Several studies have been made to understand genetic control of essential oil biosynthesis in the leaf and polyphenols in citrus somatic hybrids (7-10). The conclusion of these studies was that somatic hybridization did not result in a simple addition of parental traits (7, 10, 11). For example, Gancel et al. (10, 11) showed that somatic hybrids combining Willow leaf mandarin with sweet orange, grapefruit, and lemon exhibited a leaf aromatic profile close to their mandarin parent. However additive behaviour was observed in a combination between sweet orange and grapefruit (12). Certain authors also mention a general decrease in leaf sesquiterpenoid biosynthesis in somatic hybrids compared with their parents (11). For pulp polyphenols, Tusa et al. (7) observed that the metabolic pattern of a somatic hybrid between Valencia sweet orange and Femminello lemon represented an intermediate position between those of the parents.

Sugars, acids and aromatic compounds are recognized as major components in fruit quality (13, 14). These components vary greatly among the different varieties of citrus. The acidity of the citrus fruit results directly from the citric acid cycle. The mitochondria are the site of biosynthesis in the citric acid cycle but the genes involved are located in the nuclear genome. The biosynthesis of sugars is much more complex because the chloroplast and mitochondria play an important role in photosynthesis and respiration, respectively. We previously studied a cybrid that possessed nuclear and chloroplast genomes from Eureka lemon plus mitochondria from Willow leaf mandarin. These results showed that the main genetic

information for biosynthesis of compounds involved in fruit quality is contained in the nucleus (15). To evaluate the effects of allotetraploidy on the biosynthesis of fruit quality components, we reported a study on an allotetraploid somatic hybrid (WLM + EUR) between Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) and Eureka lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.), produced by symmetric protoplast fusion (16). This hybrid is of great interest because it combines mandarin cytoplasm with nuclei from both lemon and mandarin, two genotypes that display very strong differentiation in fruit quality. The objective of the present study was to analyze the effects of the co-existence of the two parental nuclear genomes on the biosynthesis of the fruit quality components.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials. The study was conducted on fruits of Willow leaf mandarin SRA 133 (*Citrus deliciosa* Ten.), Eureka lemon SRA 4 (*Citrus limon* (L.) Burm.), and their somatic allotetraploid called WLM + EUR (*Citrus deliciosa* Ten.) + (*Citrus limon* (L.) Burm.). WLM + EUR was produced by symmetric protoplast fusion (16). WLM + EUR and the two parents were all grafted onto volkameriana rootstock (*Citrus limonia* Osb.) and randomly planted in the same field at the *Station de Recherche Agronomique* (INRA/CIRAD) in San Giuliano (Corsica, France) in 2002.

Genetic characterization. Ploidy level was determined by flow cytometry (17) and by chromosome count (18). Molecular markers were studied by PAGE in sequencing gels with silver staining. The nuclear genome was characterized using 26 polymorphic SSR markers (19). The chloroplast genome was characterized using four chloroplastic SSR markers (20). The origin of the mitochondrial genome was studied using four universal PCR primers described by Froelicher et al. (21) (submitted).

Fruit sampling for analysis of acidity and sugars. Fruits were harvested at 15-day intervals from December to February from three trees per variety at stage III of fruit development (22). Four fruits were collected from each tree at each sampling. Fruits were peeled and their pulp was frozen in liquid nitrogen and stored at -140°C. The frozen fruit pulp was then lyophilized and powdered before analysis.

Titrateable acidity. One hundred milligrams of powdered pulp were suspended in 5 mL of bidistilled water. Titrateable acidity was determined by titration to pH 8.1 with 0.1 mol L⁻¹ NaOH, using an automatic Mettler titrator DL25 (Mettler-Toledo, France). Titrateable acidity was expressed as milliequivalent per gram of fresh pulp (meq g⁻¹ f.p.).

Analysis of organic acids and sugars. One hundred milligrams of powdered pulp were dissolved in 5 mL of bidistilled water and centrifuged at 160 g for 20 min. The supernatant was filtered through 25 mm syringe filters, 0.45 µm cellulose acetate membranes (VWR). Organic acids and sugars were analyzed with an analytical HPLC unit (Perkin-Elmer, Series 200, France) as previously described by Albertini et al. (23).

Data was acquired using TotalChrom™ software for Windows version 6.2 (Perkin-Elmer Instruments, Shelton, U.S.A.). Concentrations of organic acids and sugars were expressed as milligrams per gram of fresh pulp (mg g⁻¹ f.p.).

Sampling of peel essential oils and analysis of GC, GC/MS, ¹³C NMR. The peel of at least 30 ripe fresh fruits per genotype was subjected to water distillation using a Clevenger-type apparatus for 3.5 h.

Identification of the components was based on: (i) their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns determined by comparing the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation with those of authentic compounds or literature data (24); (ii) computer matching with commercial (25-27) and laboratory-made mass spectral libraries and by comparing spectra with those of our own library or data in the literature (24, 26, 28) and (iii) by ¹³C-NMR spectroscopy, following the method developed and computerised in our laboratories, using home-made software and our spectral data library (29).

Statistical analysis. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure of SAS (SAS Institute inc., 1989) to analyze quantitative differences among the three genotypes. Different amounts of aromatic compounds were used to process cluster analysis with the Ward method on R software (www.R-project.org).

RESULTS

Genetic characterization. Flow cytometry analysis and chromosome counts showed that WLM + EUR is tetraploid ($2n = 4x = 36$) (Figure 1). Molecular markers were chosen to display polymorphism between the parents and enabled us to identify the genomic origin of the somatic hybrid. Analysis of nuclear DNA by 26 SSR markers revealed that WLM + EUR possessed alleles from both Eureka lemon and Willow leaf mandarin (Figure 2a). Chloroplast SSR and mitochondrial primers enabled the two parents to be clearly distinguished and revealed that WLM + EUR conserved the chloroplast and mitochondria from Willow leaf mandarin (Figure 2b, 2c). Molecular analysis showed that WLM + EUR was allotetraploid with cytoplasm from Willow leaf mandarin.

Titrateable acidity. Titrateable acidity was analyzed during stage III of fruit maturation from 180-260 days after anthesis (DAA). Eureka lemon and WLM + EUR had the most acidic fruits with an average of $0.80 \text{ meq g}^{-1} \text{ f.p.}$ and $0.64 \text{ meq g}^{-1} \text{ f.p.}$ respectively. The allotetraploid was close to Eureka lemon, since Willow leaf mandarin was less acidic with an average of $0.11 \text{ meq g}^{-1} \text{ f.p.}$

Organic acid content at the mature fruit stage. Seven organic acids were detected and identified in pulp of the three genotypes. The dominant acid was citric acid representing an average of 89.86% of total organic acids for Eureka lemon, 89.34% for WLM + EUR, and 72.27% for Willow leaf mandarin. Malic acid was the second highest with an average of 18% of total organic acids in Willow leaf, and 9% in Eureka lemon and the somatic hybrid. Other acids such as oxalic, ascorbic, succinic, tartaric and quinic acid were present in very low amounts compared to the two main acids.

The somatic hybrid displayed high amounts of citric acid, $37 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ on average, still close to its lemon parent, $45 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ on average (Figure 3a). Willow leaf mandarin had very low amounts of citric acid, $7 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ on average.

The amounts of malic acid decreased gradually from 180 DAA to 260 DAA in Eureka lemon and in the somatic hybrid, but remained relatively constant in Willow leaf mandarin (Figure 3b). Eureka lemon displayed higher amounts of malic acid ($4.63 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$) than Willow leaf ($2.10 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$). WLM + EUR was closer to Eureka lemon with $3.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ on average. The amounts of ascorbic acid in Willow leaf mandarin decreased gradually from $0.41 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ and reached $0 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ at 260 DAA. The somatic hybrid and Eureka lemon displayed the same changing pattern with a constant level of ascorbic acid, $0.44 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ and $0.40 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ respectively (Figure 3c).

Sugar contents at the mature fruit stage. Three major sugars (sucrose, glucose and fructose) were identified in pulp of the three genotypes. Willow leaf mandarin fruits had much higher sugar contents than Eureka lemon and WLM + EUR (Figure 4). The concentration of sucrose in fruit pulp of Willow leaf mandarin decreased with maturity from $42.43 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ to $28.37 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ whereas in WLM + EUR and Eureka lemon, it remained relatively constant at $12 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ and $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$ (Figure 4a). The somatic hybrid showed amounts of sucrose that were intermediate between the two parents. In contrast to sucrose, Willow leaf mandarin showed an increase in glucose from 195 DAA until 260 DAA (Figure 4b). The somatic hybrid displayed intermediate values of glucose (7 to $14 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$) compared with those of Willow leaf mandarin (16.78 to $37.87 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$) and Eureka lemon (2 to $4 \text{ mg g}^{-1} \text{ f.p.}$). The somatic hybrid was closer to Willow leaf mandarin for fructose

contents with 9.8 and 9.2 mg g⁻¹ f.p., respectively, than to Eureka lemon with 4.5 mg g⁻¹ f.p. on average (Figure 4c).

Chemical composition of peel oils. Thirty-six components were identified in peel essential oils, accounting for 98.8 to 99.8% of the total amount of oils (Table 1). Peel oils consisted almost exclusively of hydrocarbons with limonene as the major component in the three genotypes (65.0% in Willow leaf mandarin, 68.2% in WLM + EUR, and 62.6% in Eureka lemon). The other components were present in lower amounts. γ -terpinene was present in higher amounts in Willow leaf mandarin (18.7%) and in WLM + EUR (15.2%) than in Eureka lemon (7.7%). However, β -pinene was present in much larger amounts in Eureka lemon peel oil (13.0%) than in peel oils of Willow leaf mandarin (1.7%) and WLM + EUR (4.5%). Methyl N-methylantranilate represented 3.1% of the total amount of Willow leaf mandarin peel oil but was nearly absent in Eureka lemon (tr) and WLM + EUR (0.2%). Citral (geranial + neral) and α -terpinene were also nearly absent in Willow leaf mandarin and the somatic hybrid peel oils (traces and 0.3%) but represented respectively 2.4% and 1.2% of the total amount of Eureka lemon peel oil (Table 1). When all aromatic *compounds* were considered as variables, *cluster analysis* grouped Willow leaf mandarin and WLM + EUR together separate from Eureka lemon (Figure 5).

DISCUSSION

Genetic analyses revealed that WLM + EUR possessed nuclear genomes from both Willow leaf mandarin and Eureka lemon plus cytoplasm from Willow leaf mandarin. The parents displayed different acid profiles. Eureka lemon had an acidic profile (0.80 meq g⁻¹ f.p.) while Willow leaf mandarin's profile was less acid (0.11 meq g⁻¹ f.p.). In citrus juice, titratable acidity is known to be largely due to citric acid (23, 30, 31), which is the major organic acid at the mature stage. The somatic hybrid was characterized by an acidic profile (0.64 meq g⁻¹ f.p.) and also displayed the same high level of citric acid as Eureka lemon (Figure 3a). The citric acid cycle takes place in the matrix of the mitochondria of juice cells (32). The citrate is then translocated to the vacuole and accumulates to steady-state level in lemon fruit, (or declines in other citrus) and is then released to the cytosol (31). The mitochondria of WLM + EUR are from Willow leaf mandarin, which accumulates a lower level of organic acids than Eureka lemon. In a previous work on a lemon cybrid with mandarin mitochondria, we showed that the origin of the mitochondria had only a slight effect on the biosynthesis of organic acids

(15). Thus it appears that the level of organic acids in the somatic hybrid fruits is regulated by both lemon and mandarin genomes with dominance of lemon. By contrast, WLM + EUR showed intermediate amounts of glucose and sucrose compared to Eureka lemon and Willow leaf mandarin fruits. In fact, lemons and mandarins also displayed significant differences in their characteristic sugar storage patterns. Lemons contained little sugar combined with high amounts of organic acids (23), in contrast to mandarins, which contained high amounts of sugar and less organic acids. The amounts of sucrose and glucose in the somatic hybrid fruits may be co-regulated by both parent genomes. However, this behaviour is not observed for fructose. Indeed, there was no significant difference in the amounts of fructose between Willow leaf mandarin and WLM + EUR. This may be explained by the fact that there is little difference between the amounts of fructose of the two parents compared to those of glucose and sucrose (Figure 4). It should be kept in mind that WLM + EUR is an allopolyploid in which genes may display dosage dependency and could be expressed additively or non-additively with possible overdominance, codominance and repression phenomena (33).

The main characteristics of the somatic hybrid are amounts of citric acid similar to those in the lemon parent and amounts of sucrose and glucose that are intermediate between its two parents. We can conclude that the amount of citric acid is obtained directly from sugars, especially glucose, with dominance of lemon phenotype. We can hypothesize an intermediate influence of the mandarin phenotype on the amount of glucose and sucrose. This hypothesis is supported by previous experiments with a cybrid that possessed nuclear and chloroplast genome from Eureka lemon and showed the same sugar patterns as its lemon parent (15). It would be interesting to determine the importance of the glycolytic pathway for the somatic hybrid and its two parents.

The somatic allotetraploid presented similar qualitative chemical composition of peel oil as its two parents. The amounts of the different components in WLM + EUR total peel oil suggest the dominance of mandarin genome, as observed by Gancel et al. (10) for leaf aromatic compounds of WLM + EUR. Most of the aromatic compounds in peel oil of the somatic allotetraploid were closer to Willow leaf mandarin than to Eureka lemon. Indeed, amounts of compounds such as α -terpinene, β -pinene, neral and geranial in WLM + EUR peel oil, were very low and closer to mandarin than to lemon (Table 1), although β -pinene, neral and geranial are characteristic of lemon peel oil (34, 35). However, the synthesis of methyl N-methylantranilate, a characteristic compound of mandarin (36, 37), was reduced in WLM + EUR peel oil. Global dominance of mandarin for aromatic peel oil content was confirmed by

cluster analysis with the Euclidean distance calculated from the amounts of aromatic compounds. WLM + EUR and Willow leaf mandarin were grouped in the same cluster and separate from Eureka lemon (Figure 5). Our results are concordant with the results of Gancel et al. (10) for the leaf aromatic profile of WLM + EUR. It appears that for these biosynthetic pathways, phenotypic dominance of mandarin is conserved in the different organs of the somatic hybrid.

This study demonstrated that the transmission of characters in the somatic hybrid is complex. Organic acids, sugars and peel aroma biosynthetic pathway were shown to be co-regulated by the genome of the two parents. However, in some cases, there was dominance of one of the parental characteristics, such as lemon for the biosynthesis of organic acids and mandarin for the biosynthesis of aroma. We are currently examining gene expression at fruit maturity in WLM + EUR and its parents with a genome-wide 20K cDNA microarray, developed under the Citrus Functional Genomic Project (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) (38). This will help in the interpretation of the behaviour of the somatic hybrid.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the *Collectivité Territoriale de Corse* for granting this study, and Camille Carcouet for her technical help in experiments.

LITERATURE CITED

- (1) Grosser, J. W.; Ollitrault, P.; Olivares-Fuster, O. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant* **2000**, 36, 434-449.
- (2) Wu, J.; Ferguson, A. R.; Mooney, P. A. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica* **2005**, 141, 229-235.
- (3) Bosco, S. F. del.; Siragusa, M.; Abbate, L.; Lucretti, S.; Tusa, N. Production and characterization of new triploid seedless progenies for mandarin improvement. *Scientia Hort.* **2007**, 114, 258-262.

- (4) Guo, W. W.; Deng, X. X.; Yi, H. L. Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* **2000**, 116, 281-285.
- (5) Grosser, J. W.; Chandler, J. L.; Duncan, L. W. Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Hort.* **2007**, 113, 33-36.
- (6) Ollitrault, P.; Guo, W.; Grosser, J. W. Somatic hybridization. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, Khan, I. A., Ed.; Cabi Publishing: oxfordshire, United Kingdom, 2007; pp 235-260.
- (7) Tusa, N.; Abbate, L.; Renda, A.; Ruberto, G. Polyphenols distribution in juices from Citrus allotetraploid somatic hybrids and their sexual hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9089-9094.
- (8) Alonzo, G.; Bosco, S. F. del.; Palazzolo, E.; Saiano, F.; Tusa, N. Citrus somatic hybrid leaf essential oil. *Flavour Frag. J.* **2000**, 15, 258-262.
- (9) Bosco, S. F. del.; Palazzolo, E.; Scarano, M. T.; Germana, M. A.; Tusa, N. Comparison between essential oil yield and constituents of an allotetraploid somatic hybrid of Citrus and its parents. *Adv. Hort. Sci.* **1998**, 12, 72-77.
- (10) Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6006-6013.
- (11) Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour Frag. J.* **2005**, 20, 626-632.
- (12) Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2224-2230.
- (13) Cercos, M.; Soler, G.; Iglesias, D. J.; Gadea, J.; Forment, J.; Talon, M. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Mol. Biol.* **2006**, 62, 513-527.
- (14) Vangdal, E. Quality criteria for fruit for fresh consumption. *Acta Agric. Scand.* **1985**, 35, 41-47.

- (15) Bassene, J.-B.; Berti, L.; Carcouet, E.; Dhuique-Mayer, C.; Fanciullino, A.-L.; Bouffin, J.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y. Influence of Mitochondria Origin on Fruit Quality in a Citrus Cybrid. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8635–8640.
- (16) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Carreel, F.; d'Hont, A.; Luro, F.; Bruyere, S.; Cabasson, C.; Lotfy, S.; Joumaa, A.; Vanel, F.; Maddi, F.; Treanton, K.; Grisoni, M. Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. *Cahiers Agric.* **2000**, 9, 223-236.
- (17) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Luro, F.; Duperray, C. Nuclear genome size variations in Citrus. *Fruits (Paris)* **1994**, 49, 390-393, 475-476.
- (18) D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, P.; Berding, N.; Glaszmann, J. C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* **1996**, 250, 405-413.
- (19) Froelicher, Y.; Dambier, D.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Lotfy, S.; Didout, C.; Beaumont, V.; Brottier, P.; Risterucci, A. M.; Luro, F.; Ollitrault, P. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Notes* **2008**, 8, 119-122.
- (20) Cheng, Y.; Vicente, M. C. d.; Meng, H.; Guo, W.; Tao, N.; Deng, X. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree Physiol.* **2005**, 25, 661-672.
- (21) Froelicher, Y.; Mouhaya, W.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Hussain, S.; Kamiri, M.; Curk, C.; Luro, F.; Morillon, R.; Ollitrault, P. New universal mitochondrial PCR markers reveal maternal citrus phylogeny and give new information on mandarin and lime origin. submitted.
- (22) Bain, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.* **1958**, 6, 1-24.
- (23) Albertini, M. V.; Carcouet, E.; Pailly, O.; Gambotti, C.; Luro, F.; Berti, L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8335-8339.
- (24) Joulain, D.; König, W. A. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*; E. B. Verlag: Hamburg, Germany, 1998; pp 660.
- (25) König, W.A.; Hochmuth, D.H.; Joulain, D. *Terpenoids and related constituents of essential oils*. Library of MassFinder 2.1; Institute of Organic Chemistry: Hamburg, Germany, 2001.

- (26) McLafferty, F. W.; Stauffer, D. B. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, Mass spectrometry library search system benchtop/PBM, version 3.10d; Palisade Co: Newfield, 1994.
- (27) National Institute of Standards and Technology. *PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH mass spectral library*; Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CN 1999.
- (28) Adams, R. P. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*; Academic Press: New York, 1995.
- (29) Tomi, F.; Bradesi, P.; Bighelli, A.; Casanova, J. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **1995**, 1, 25-34.
- (30) Rasmussen, G. K. Seasonal changes in organic acid content of Valencia orange fruit in Florida. *Amer. Soc. Hort. Sci.* **1963**, 84, 181-187.
- (31) Sadka, A.; Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K. B. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol. Planta.* **2000**, 108, 255-262.
- (32) Tucker, G. A., Introduction. In *Biochemistry of fruit ripening*, Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G., Eds.; Chapman and Hall: London, United Kingdom, 1993; pp 1-37.
- (33) Chen, Z. J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, 58, 377-406.
- (34) Vekiari, S. A.; Protopapadakis, E. E.; Papadopoulou, P.; Papanicolaou, D.; Panou, C.; Vamvakias, M. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 147-153.
- (35) Verzera, A.; Trozzi, A.; Zappala, M.; Condurso, C.; Cotroneo, A. Essential oil composition of *Citrus meyerii* Y. Tan. and *Citrus medica* L. cv. Diamante and their lemon hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4890-4894.
- (36) Lota, M. L.; Rocca Serra, D. d.; Tomi, F.; Casanova, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, 29, 77-104.
- (37) Lota, M. L.; Serra, D. R. d.; Tomi, F.; Casanova, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28, 61-78.
- (38) Martinez-Godoy, M. A.; Mauri, N.; Juarez, J.; Marques, M. C.; Santiago, J.; Forment, J.; Gadea, J. A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* **2008**, 9: 318.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Metaphase of the tetraploid somatic hybrid “WLM + EUR”.

Figure 2. Analysis of the genetic structure of “WLM + EUR”: (a) Nuclear SSR marker mCrCIR06B07; (b) Chloroplastic SSR marker ntcp9; (c) Mitochondrial primer *rrn5/rrn18-1*; Lane 1, WLM + EUR; lanes 2, Willow leaf mandarin; lane 3, Eureka lemon.

Figure 3. Organic acid levels in fruit pulp during the mature stage of Willow leaf mandarin (●), WLM + EUR (○) and Eureka lemon (Δ). Each point on the graph shows the mean and standard error of three biological replicates.

Figure 4. Sugar levels in fruit pulp during the mature stage of Willow leaf mandarin (●), WLM + EUR (○) and Eureka lemon (Δ). Each point on the graph shows the mean and standard error of three biological replicates.

Figure 5. Dendrogram of cluster analysis with amounts of aromatic compounds from Willow leaf mandarin, WLM + EUR, and Eureka lemon using the Ward method and Euclidean distance.

Table 1: Chemical composition of peel oils

Constituents	Apol	Pol	Willow leaf	WLM + EUR	E. lemon
α -thujene	924	1025	0.6	0.6	0.3
α -pinène	932	1025	1.6	1.6	1.6
camphene	944	1066	-	tr	0.1
sabinene	966	1119	0.2	0.6	1.7
β -pinene	972	1110	1.7	4.5	13.0
octanal*	980	1294	0.2	tr	0.1
myrcene*	980	1157	1.8	2.0	1.7
α -phellandrene	997	1162	-	tr	-
α -terpinene	1010	1176	0.3	0.3	1.2
p-cymene	1013	1264	2.1	3.4	1.1
limonene*	1024	1200	65.0	68.2	62.6
β -phellandrene*	1024	1209	0.3	0.3	0.4
(<i>E</i>)- β -ocimene	1038	1245	-	tr	0.1
γ -terpinene	1052	1243	18.7	15.2	7.7
p-cymenene	1074	1432	-	0.1	-
Terpinolene	1079	1277	0.8	0.7	0.3
nonanal*	1082	1388	-	tr	0.2
linalool*	1082	1550	0.5	tr	0.3
<i>cis</i> -limonene-1,2 oxide [#]	1116	1440	-	tr	tr
<i>trans</i> -limonene-1,2 oxide [#]	1120	1450	tr	tr	tr
terpinen-4-ol	1161	1605	0.4	0.3	0.5
α -terpineol	1172	1701	0.4	0.2	0.5
Nerol	1208	1792	0.2	tr	0.4
neral	1214	1679	tr	tr	1.0
geraniol	1232	1837	-	-	0.4
geranial	1237	1731	tr	-	1.4
thymol	1266	2189	0.7	0.2	-
citronellyl acetate	1332	1654	-	0.1	0.1
neryl acetate	1343	1725	-	-	1.1
geranyl acetate	1360	1748	-	-	0.9
Me N-methylantranilate	1378	2082	3.1	0.2	tr
(<i>E</i>)- β -caryophyllene	1424	1586	-	0.1	0.1
<i>trans</i> - α -bergamotene	1432	1580	-	0.1	0.4
β -bisabolene	1499	1724	-	0.1	0.6
α -sinensal	1724	2323	0.2	0.2	-
nootkatone	1780	2530	-	0.1	-
Total			98.8	99.1	99.8

Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1), except for compounds with an asterisk (*), percentage on BP-20. tr, traces. # (methyl vs. isopropyl)

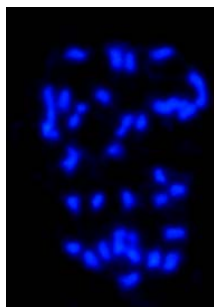


Figure 1

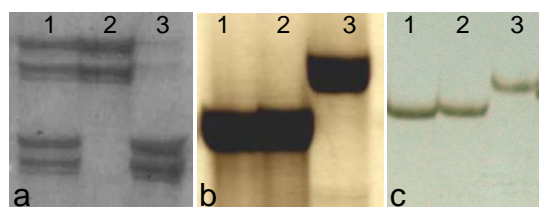


Figure 2

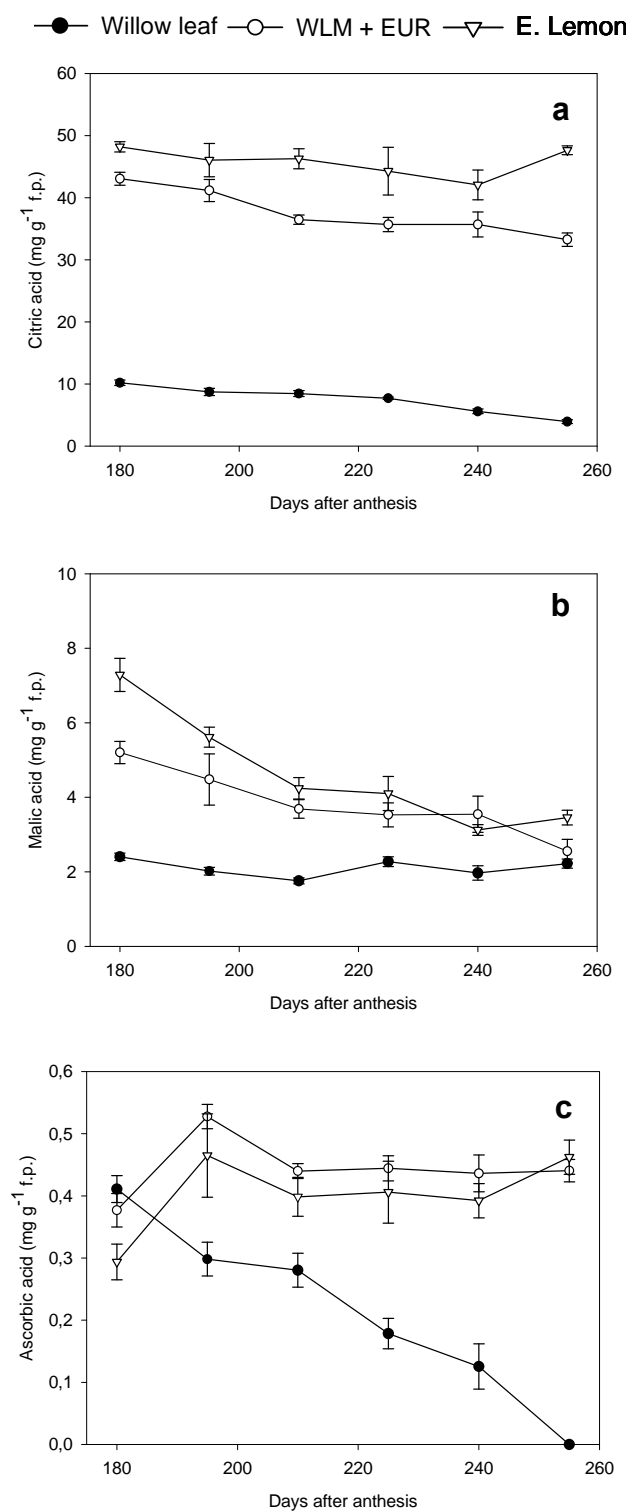


Figure 3

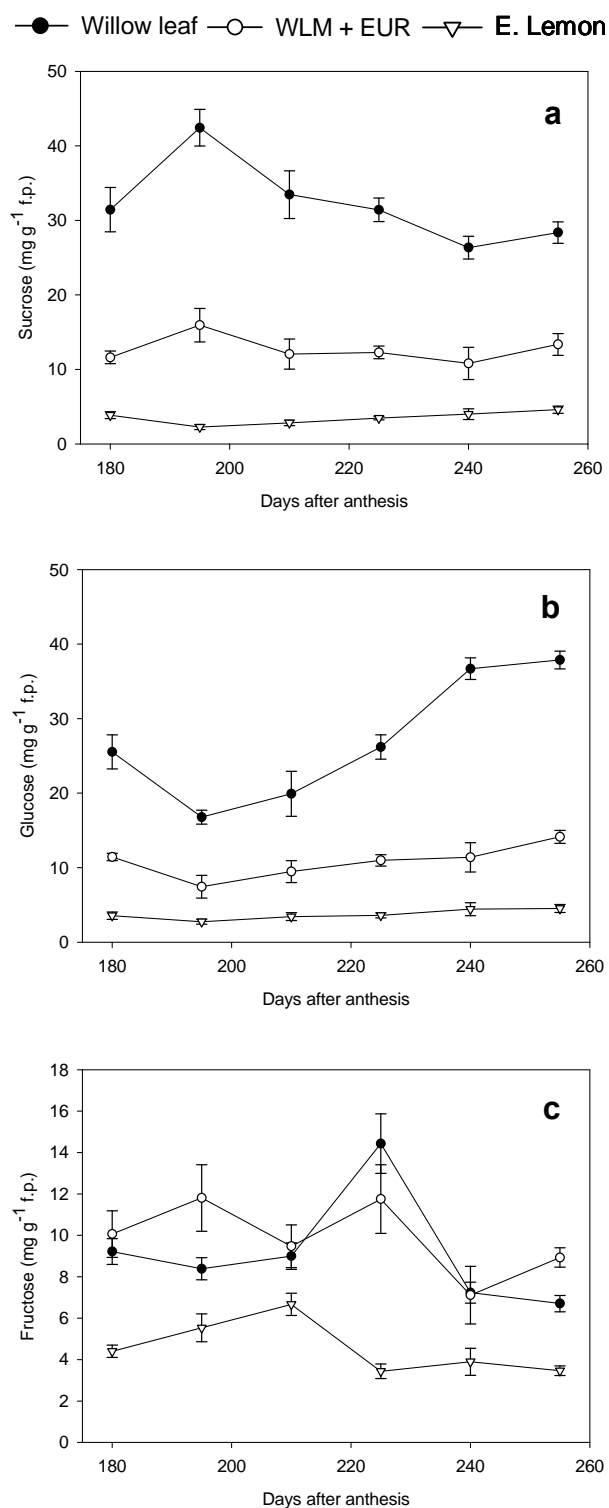


Figure 4

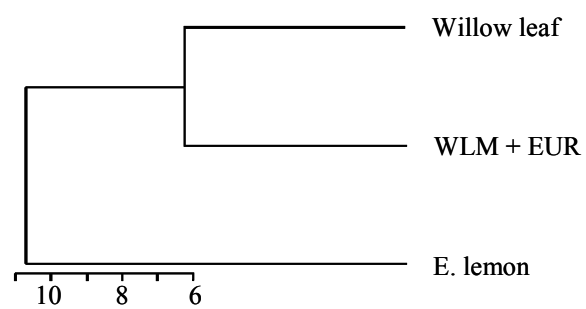


Figure 5

III.7. LA COMPOSITION DES CAROTENOÏDES DE LA PULPE DE L'HYBRIDE ALLOTETRAPLOÏDE EST CORRELEE AVEC UNE EXPRESSION NON ADDITIVE DES GENES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES

III.7.1. Résumé de l'article

Introduction

L'allopolyplœdie est connue modifier la régulation de l'expression des gènes et aussi induire l'apparition de nouveaux phénotypes. Nous présentons dans cette étude, une analyse de la transmission des caractères phénotypiques chez un hybride somatique allotétraploïde en relation avec la génomique fonctionnelle. Le genre *Citrus* représente un modèle intéressant pour de telles études. En effet, l'hybridation somatique est une partie intégrante des programmes d'amélioration des agrumes visant à créer de nouveaux porte-greffes allotétraploïdes ou à générer des hybrides triploïdes par des croisements sexués entre des allotétraploïdes et des variétés diploïdes. Ces programmes de manipulation de la ploïdie conduisent à de nouvelles questions de recherche sur l'expression génomique et phénotypique des polyploïdes d'agrumes. Nous avons choisi comme modèle d'étude la biosynthèse des caroténoïdes chez un hybride allotétraploïde entre *C. deliciosa* et *C. limon* en raison de leur grande différenciation en caroténoïdes et des connaissances que nous avons développées sur les bases moléculaires de cette différenciation phénotypique.

Matériel et méthodes

Nous avons effectué une évaluation quantitative et qualitative de la composition des caroténoïdes dans la pulpe des fruits de deux espèces parentales (*C. deliciosa* et *C. limon*) et de leur hybride somatique par HPLC en utilisant une colonne C₃₀ et un détecteur à barrettes de diodes. Nous avons également analysé par PCR en temps réel, l'expression de 7 gènes (*CitDxs*, *CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcy-b*, *CitHy-b*, *CitZep*) de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et d'un gène (*CitNced1*) impliqué dans la synthèse de l'acide abscissique à partir des caroténoïdes.

Résultats et discussion

Le citronnier contient très peu de caroténoïdes contrairement au mandarinier. En effet, seules de très faibles teneurs en β -carotène et β -cryptoxanthine sont observées dans la pulpe

du citronnier tandis que de fortes concentrations en β -cryptoxanthine mais également de phytoène, phytofluène, β -carotène, lutéine, zeaxanthine et violaxanthine sont observées pour le mandarinier. La teneur totale des caroténoïdes contenus dans les sacs à jus du mandarinier est 60 fois supérieure à celle du citronnier. L'hybride allotétraploïde produit tous les composés de la mandarine, mais à des concentrations beaucoup plus faibles (~10 fois moins). L'expression des gènes est significativement plus élevée chez le mandarinier comparé au citronnier pour six des huit gènes analysés. Une expression non additive est observée pour six gènes chez l'hybride allotétraploïde, trois avec une dominance de l'expression du citronnier, deux avec la dominance d'expression du mandarinier et un gène avec une expression transgressive.

La présence de l'ensemble des allèles du mandarinier, l'expression non additive des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes en particulier la dominance de la faible expression du citronnier pour les gènes *CitDxs*, *CitZds* et *CitLcyb*, ainsi que l'expression transgressive de *CitNced1* comparée aux parents, permettent d'expliquer le nouveau phénotype de l'hybride somatique. En effet, cette néorégulation conduit à une sous production des précurseurs et des premiers caroténoïdes de la chaîne et à la relative surproduction de l'ABA en tant que produit final de la voie de biosynthèse de caroténoïdes.

III.7.2. Article

Titre: Novel pattern of carotenoid contents in the pulp of a Citrus allotetraploid somatic hybrid is associated with non additive expression of the genes of the carotenoid biosynthesis pathway

**BASSENE, J. B.; FROELICHER, Y.; DHUIQUE-MAYER, C.; MOUHAYA, W.;
ANCILLO, G.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P.**

Article à soumettre *BMC Plant Biology*

Novel pattern of carotenoid contents in the pulp of a Citrus allotetraploid somatic hybrid is associated with non additive expression of the genes of the carotenoid biosynthesis pathway.

Jean Baptiste Bassene¹, Yann Froelicher¹, Claudie Dhuique-Mayer², Waffa Mouhaya¹, Gema Ancillo³, Raphael Morillon³⁻⁴ and Patrick Ollitrault^{3-4}*

¹CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), UPR Multiplication végétative, F-20230 San Giuliano, France. ²CIRAD, UMR QUALISUD Avenue J. F. Breton - TA B-95/16 - 34398 Montpellier Cedex 5, France. ³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Centro de *Proteccion vegetal y biotecnologia*, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain. ⁴ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France.

**Author to whom correspondence should be addressed. CIRAD, UPR “Amélioration génétique des espèces à multiplication végétative”, Centro de Proteccion vegetal y biotecnologia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) - 46113 - Moncada - Valencia Spain. Fax: +(34) 963 424 106. E-mail: patrick.ollitrault@cirad.fr*

Abstract

Background

Allopolyploidy is known to induce novel pattern of gene expression and often new phenotypes. We report in the present paper the first attempt to analyze phenotypic inheritance in an allotetraploid somatic hybrid in relation with functional genomic. Citrus is an interesting model for such study. Indeed somatic hybridization is an integral part of citrus breeding schemes aiming to create new allotetraploid rootstocks or to synthesize triploid hybrids by sexual crossing between allotetraploid hybrids and diploid varieties. Such ploidy manipulation at interspecific level leads to new research questions regarding phenotypic and genomic expression of polyploid citrus. Carotenoid biosynthesis pathway and an allotetraploid hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* have been chosen as model due to the strong phenotypical (carotenoid contents) differentiation of the two parental species and the previous knowledge on molecular basis of interspecific phenotypical differentiation.

Results

Quantitative evaluation of carotenoid compounds in the fruit pulp of the two parental species and the hybrid was made by HPLC using a C₃₀ column and a photodiode array detector. Only very low levels of β -carotene and β -cryptoxanthin were observed in lemon while β -cryptoxanthin was a major component of *C. reticulata* which also display relatively high level of phytoene, phytofluene, β -carotene, lutein, zeaxanthin and violaxanthin. Total carotenoid content in mandarin juice sac was 60 times greater than for lemon. The allotetraploid hybrid produced all the compounds of the mandarin but with very low levels (about 10 fold lower than mandarin).

Real time RT-PCR on total RNA from juice sacs was used to study expression of 7 genes (*CitDxs*, *CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcy-b*, *CitHy-b* and *CitZep*) of the carotenoid biosynthesis pathway and 1 gene (*CitNced1*) involved in the synthesis of abscisic acid from carotenoid. Gene expression was significantly higher for mandarin than lemon for six of the eight genes analyzed. Non additive expression was observed for six genes in the allotetraploid hybrid; three with partial dominance of lemon expression, two with mandarin expression dominance and one with transgressive expression.

Conclusions

A complete set of functional alleles from mandarin, non additive expression of the gene of the carotenoid biosynthetic pathway and particularly the dominance of lemon lower expression for *CitDxs*, *CitZds* and *CitLcyb* as well as transgressive expression of *CitNced1* compared with its two parents should explain the novel phenotype of the somatic hybrid. Indeed, this neoregulation leads to an under production of the precursor and first carotenoid molecules and an over production of ABA as final product of the carotenoid biosynthesis pathway.

Citrus somatic hybridization via protoplast fusion has become an integral part of worldwide citrus variety improvement programs and several hundreds of interspecific and intergeneric allotetraploid hybrids have been synthesized [1, 2]. Applications of somatic hybridization for citrus scion improvement include the production of allotetraploid breeding parents that can be used in interploid crosses to generate seedless triploids, and the direct production of triploids by haploid + diploid fusion. For rootstock, it allows cumulating all dominant characters of complementary heterozygous parents and to combine citrus with sexually incompatible genera that possess traits of interest for germplasm expansion.

While most of the citrus germplasm is diploid, these new breeding strategies aiming to obtain seedless fruits through triploidy or to cumulate resistance traits in somatic hybrid rootstock lead to manipulate the ploidy of the gene pool at interspecific level. This development of the triploid and tetraploid compartments of the citrus gene pool open new research areas regarding the phenotypic and genomic expression of polyploid citrus. Recent studies in other crops demonstrated that important modifications of gene expression occurs immediately after allopolyploidisation events [3-6]. Gene silencing is frequent in allotetraploid. It varies between 2.5% to 11% in allopolyploids between *Arabidopsis thaliana* and *A. arenosa* [6, 7], and between 1 and 5% in corn allopolyploids [8] to reach 25% in allotetraploids cotton plants [9]. Several studies suggest that these variations of expression are repeatable for particular genes while gene silencing appears to be stochastic in other part of the genome [6]. Moreover in cotton the neoregulation of the genome appears to be organ-specific leading to subfunctionalisation of the duplicated genes [3, 9]. The neoregulation of parental genome expression in allopolyploid plants should partially explain that they often present new phenotypes, outgoing of the ranges of variability of the diploid gene pool [10].

Somatic hybrids are interesting models to study immediate effect of allopolyploidisation on the regulation of gene expression and subsequent phenotype elaboration. Allotetraploid citrus obtained by somatic hybridization displays some morphological vegetative traits (leaf thickness, density and size of stomata, etc) similar to autotetraploid arising from chromosome doubling in nucellar cells [11]. These specific traits should be associated with tetraploidy *per se*. However inheritance of other traits appears clearly linked with the parental combinations. For leaf volatile compounds, Gancel *et al.* [12] concluded for a strong dominance of *C. reticulata* cv 'willow leaf mandarin' when combined with seven other citrus species while

codominance was observed in other specific combinations such as *C. sinensis* + *C. paradisi* [13]. 2-D electrophoresis analysis of the leaf proteome of two allotetraploid somatic hybrids combining willow leaf mandarin with mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and kumkat (*Fortunella margarita*) displayed a closer relation between the two allotetraploid hybrids and their mandarin parent than with their other parents [14]. More recently, [15] analyzed the inheritance of several fruit quality traits in an allotetraploid citrus somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*. Strong dominance of lemon was found for acid compounds, partial dominance of lemon was found for sucrose and glucose while dominance of mandarin was observed for fructose and most of the aromatic compounds except methyl N-methylanthranilate. Biosynthesis pathways of these primary and secondary metabolites are very complex and the molecular bases of interspecific phenotypic differentiation are not yet elucidated. It is thus difficult to infer any molecular explanation to these observations.

Conversely the pathway of carotenoid biosynthesis are well established [16, 17] (Figure 1) and corresponding genes have been identified in citrus EST databases [18]. Moreover the major steps of the pathway leading to interspecific differentiation of carotenoid accumulation in citrus fruits have been identified [18-21]. In horticultural crops carotenoids play a major role in fruit, root or tuber coloration [22] and in nutritional quality [23]. Carotenoids are synthesized in plastids by nuclear-encoded enzymes [17]. The immediate precursor of carotenoids is geranylgeranyl diphosphate (GGPP). GGPP is mainly derived from the methylerythritol phosphate (MEP) pathway [24]. Alos *et al.* [25] have analyzed the role of DXS (a key enzyme in the MEP pathway) in carotenoid biosynthesis in the peel of *Citrus* fruit. They found that the highest expression of *Dxs* coincided with a peak in total carotenoid and chlorophyll abundance suggesting that there is a competition between carotenoid and chlorophyll pathways for GGPP precursor. The first carotenoid: 15-*cis*-phytoene is formed by the condensation of two molecules of GGPP catalyzed by phytoene synthase (PSY). Four desaturation reactions catalyzed by two enzymes, phytoene desaturase (PDS) and ζ -carotene desaturase (ZDS), convert phytoene into the red-colored poly-*cis*-lycopene with intermediary formation of phytofluene, ζ -carotene and neurosporene. Cyclization of lycopene is a branching point: one branch leads to β -carotene and the other to α -carotene. In citrus juice sacs, the branch of β -carotene is strongly predominant [18]. Lycopene β -cyclase (LCY-b) converts lycopene into β -carotene in two steps. The synthesis of β -cryptoxanthin, one of the main pigments in the juice sacs of mandarin and orange fruit is carried out in two steps by the LCY-b and the β -carotene hydroxylase (HY-b). Violaxanthin is synthesized from the β -

cryptoxanthin in three steps: one step catalyzed by HY-b leading to zeaxanthin and two steps by zeaxanthin epoxidase (ZEP). The *Hy-b* and *Zep* genes should play an important role in the differential carotenoid accumulation in the juice sacs of mandarin and orange fruits [18, 20]. Violaxanthin may be converted into neoxanthin by the action of neoxanthin synthase (NSY). However, neoxanthin has not been identified in juice sacs of citrus [18, 21]. By the end, the enzyme 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) which catalyzes the formation of abscisic acid (ABA) from violaxanthin or neoxanthin was shown to be involved in the differentiation of carotenoid accumulation in the pulp of citrus fruit [21].

Citrus fruit are very rich in carotenoids that are the major determinants of external and pulp colour, with strong diversity among species. Kato *et al.* [20] showed that mandarin and orange juices accumulated high levels of β -cryptoxanthin and violaxanthin respectively, whereas mature lemon accumulated extremely low levels of carotenoids. A broad study in cultivated citrus species [18] demonstrated that the interspecific organization of the variability of carotenoid contents was very closely related with the genetic organization displayed by neutral molecular markers [26, 27] and thus with the global evolution process of cultivated Citrus. Qualitative analysis of the different compounds revealed three main clusters: 1: mandarins, sweet oranges and sour oranges; 2: citrons, lemons and limes; 3: pummelos and grapefruit. The same study unlighted several key steps in the interspecific diversification of the carotenoid profile. Synthesis of phytoene appeared as a limiting step for acid citrus (citrons, lemons and limes) while formation of β -carotene and α -carotene from lycopene were dramatically limited in pummelos and grapefruit. Only varieties of mandarin and oranges were able to produce violaxanthin. The relationship between carotenoid profiles of different Citrus species and biosynthetic gene expression has been investigated by Kato *et al.* [21]. These authors compared three *Citrus* species, *Citrus unshiu* Marc., *Citrus sinensis* L. Osbeck and *Citrus limon* Burm., and showed that differential carotenoid accumulation between the three species was closely related to the expression of the carotenoid biosynthetic genes (*CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcyb*, *CitHyb*, *CitZep* and *CitNced1*). Fanciullino [28] compared the gene expression in juice sac at fruit maturity between “Shamouti” sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), “Eureka” lemon (*Citrus limon* Burm.) and “Deep red” pummelo (*Citrus maxima* L.). She concluded that interspecific phenotypical variability should be associated with the variability of expression of 5 genes (*CitDxs*, *CitPsy*, *CitZds*, *CitHyb*, *CitZep*) with sweet orange having systematically the upper expression and pummelo the lower while *citrus limon* presented expression similar to pummelo for *CitDxs*, intermediary for

CitHyb and *CitZep* and close to sweet-orange for *CitPsy* and *CitZds*. Post-transcriptional regulations were also shown to be involved in phenotype elaboration, including changes in enzyme activity due to specific alleles [21, 29]. Fanciullino *et al.* [19] also proposed that the allelic diversity of *Lcy-b* and *Lcy-e*, was associated with interspecific phenotypical diversity.

The present work is the first attempt to analyze the phenotypic inheritance in an allotetraploid somatic hybrid in relation with functional genomic. A somatic hybrid between *C. reticulata* (mandarin) and *C. limon* (lemon) obtained by Ollitrault *et al.* [30] has been chosen as model due to the strong differentiation in carotenoid profiles. Moreover, molecular markers (SSRs) analysis demonstrated the complete addition of the 2 parental nuclear genomes combined with chloroplasts and mitochondria of mandarin [15]. Our study aimed to answer the following questions: (i) what are the inheritances of the different carotenoid compounds in the allotetraploid hybrid, (ii) how are inherited the expressions of the genes of the biosynthesis pathway in the allotetraploid hybrid, and (iii) does a neoregulation of this pathway be associated with an original phenotype?

Material and methods

Plant materials

The study was conducted on fruits of Willow leaf mandarin SRA 133 (*Citrus reticulata* Blanco), Eureka lemon SRA 4 (*Citrus limon* (L.) Burm.), and their allotetraploid somatic hybrid (*Citrus reticulata* Blanco) + (*Citrus limon* (L.) Burm.). The allotetraploid hybrid was produced by symmetric protoplast fusion [30]. The two parents and the allotetraploid hybrid mature budwood were all grafted onto Volkamer rootstock (*Citrus limonia* Obs.) and randomly planted in the same field at the *Station de Recherche Agronomiques* (INRA/CIRAD) in San Giuliano (Corsica, France) in 2002. Trees were subjected to the same standard cultural practices. For each genotype, 15 fruits were harvested at maturity [225 days after anthesis (DAA)] from three individual trees, in February 2007.

Carotenoid analysis

Carotenoid analysis was performed on juice sacs of fruits of Willow leaf mandarin, Eureka lemon and the allotetraploid hybrid. They were extracted, identified and quantified as described by Dhuique-Mayer *et al.* [31] and Fanciullino *et al.* [18]. Carotenoids were

extracted from 20 g of juice with 120 mg of MgCO_3 , 35 mL of ethanol/hexane (4:3 v/v plus 0.1% of BHT as antioxidant). Lycopene was added as an internal standard. Residue was first separated from the liquid phase by filtration through a filter funnel (porosity no. 2) then was re-extracted with 35 mL ethanol/hexane and finally with 30 mL of ethanol and 30 mL of hexane. Organic phases were transferred to a separatory funnel and successively washed with 2×50 mL of 10 % sodium chloride and 3×50 mL of distilled water. The hexanic phase was dried, redissolved in 20 mL of hexane and saponified overnight at room temperature with equal volume of 10 % methanolic KOH. The sample was transferred to a separatory funnel to which 50 mL of distilled water was added to separate the layers. Hexanic layer was washed with distilled water until it was free of alkali. The methanolic KOH layer was extracted with 3×10 mL of dichloromethane. The extracts were pooled and washed to remove alkali then dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 500 μL of dichloromethane and 500 μL of MTBE/methanol (80:20, v/v) then diluted 6-fold in MTBE/methanol and stored in amber vial for HPLC analysis.

Carotenoids were analyzed by high-performance liquid chromatography using an Agilent 1100 system (Massy, France). Carotenoids were separated along a C30 column [250 \times 4.6 mm i. d., 5 μm YMC (EUROP GmbH)]; the mobile phases were H_2O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL min^{-1} , column temperature was set at 25°C , and injection volume was 20 μL . A gradient program was performed: the initial condition was 40 % A/60 % B; 0-5 min, 20 % A/80 % B; 5-10 min, 4% A/81 % B/15 % C; 10-60 min 4 % A/11 % B/85 % C; 60-71 min, 100 % B; 71-72 min, back to the initial conditions for reequilibration. Absorbance was then assessed at 290, 350, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV-visible spectra were treated using the Agilent Chemstation Plus software. Quantification of Carotenoids was achieved using calibration curves with β -carotene and β -cryptoxanthin with five concentration levels from 3 to 15 mg L^{-1} (standards from Extrasynthese, Genay, France).

Total RNA isolation and RT-PCR Analysis

Fruits were peeled and their pulp was frozen in liquid nitrogen and stored at -140°C until analysis. Total RNA was isolated from juice sacs as described by Manning [32] and cleaned up with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). DNase I treatment (RNase-Free DNase Set; Qiagen) was applied in the purification column according to the manufacturer's instructions. UV absorption spectrophotometry and gel electrophoresis were performed to test RNA quality and integrity as described by Sambrook et al. [33].

Quantitative mRNA analyses were performed according to the method described by Alós et al. [25] on a Roche LightCycler 2.0 instrument. RT-PCR was performed in a total volume of 10 μ L with 50 ng total RNA, 2.5 units Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unit RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 2 μ L LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) and 2.5 μ M of gene-specific primers (Table 1) designed by Fanciulino et al. [34] and Kato et al. [21]. The RT-PCR procedure consisted of 48°C 30 min, 95°C 10 min followed by 45 cycles at 95°C 2 seconds, 60°C 10 seconds and 72°C 15 seconds. Fluorescent intensity data were acquired during the 72°C extension step. Specificity of the amplification reactions was checked by post-amplification dissociation curves and by sequencing the reaction products. To transform fluorescent intensity measurements into relative mRNA levels, a 10-fold dilution series of a RNA sample was used as the standard curve. Total RNA amounts were accurately quantified with the RiboGreen dye (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and were used to normalize mRNA levels as described by Alós et al. [25]. Values were the mean of at least three independent analyses.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc. 1989) to reveal significant differences of carotenoids content and mRNA levels between genotypes. Euclidean distances calculated from content of the different carotenoids were used to process cluster analysis with Ward method on R software (www.R-project.org).

Results and Discussion

Inheritances of the different carotenoid compounds in the allotetraploid hybrid

In order to investigate the inheritance of the different carotenoid compounds, we analyzed the carotenoid contents on the juice sacs from fruit harvested at maturity stage (225 DAA) of Willow leaf mandarin, Eureka lemon and the allotetraploid hybrid. Mandarin pulp displayed a strong orange color while the lemon was slightly yellow and the somatic hybrid presented a pale orange color (Figure 2). For HPLC interpretation, authentic standards of Lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, and lycopene were coinjected with the samples. Other peaks were tentatively identified by comparison of their chromatographic and spectral characteristics with those available in the literature obtained from the same plant

material (mandarin juices) and under the same chromatographic conditions (C₃₀ column, and a mixture of water, methanol, and MTBE as eluent) as previously described by Fanciullino *et al.* [18].

Only seven compounds were significantly detected by HPLC analysis, all being present in mandarin (Table 2). β -cryptoxanthin was the major component in mandarin with more than half of the total carotenoid content. Total carotenoid content was more than 60 times higher in mandarin (~30 mg/L) compared with lemon (0.45mg/L). Moreover, only two carotenoid compounds were detected in lemon: β -carotene and β -cryptoxanthin. These observations are very similar to the one of Kato *et al.* [21] with other mandarin and lemon cultivars and consistent with the global differentiation between acid citrus and the mandarin/orange group described by Fanciullino *et al.* [18]. The allotetraploid hybrid display all the compound found in mandarin but at very low level (Table 2). Relative contents vary from 3% for violaxanthine to 14% for β -cryptoxanthin with an average ratio of 10%. Thus at qualitative level the somatic hybrid can be considered identical to mandarin: it is able to synthesize all the carotenoid compounds found in cultivated citrus as mandarin do [18]. This should be explained by the presence in the allotetraploid hybrids of functional alleles, coming from mandarin, for all the genes involved in the carotenoid biosynthesis pathway. However at quantitative level we have observed a strong dominance of the lemon parent, as it is clearly visualized in the cluster analysis based in Euclidian distances elaborated from the contents of the different carotenoid (Figure 3). If we look to the carotenoid profiles of the 25 genotypes representative of the citrus genus analyzed by Fanciullino *et al.* [18], it is interesting to note that the genotypes presenting the closest phenotype to the allotetraploid hybrid are Volkamer lemon and Rangpur lime. However for these two genotypes the global decrease of carotenoid contents compared with mandarin is lower than for the somatic hybrid; they display respectively 37% and 30% of the total content of *C. reticulata*. According to Nicolosi *et al.* [27] Rangpur lime (*C. limonia* Obs.) and Volkamer lemon (*C. limonia* Obs.), are respectively hybrids between citron (*C. medica*) and mandarin and between citron and sour orange (*C. aurantium*), probably back-crossed with the mandarin gene pool while lemon should be a direct hybrid between citron and sour orange. It should thus be considered that Volkamer lemon and the allotetraploid hybrid arose from similar parentages respectively mandarin x (sour orange x citron) and mandarin + (sour orange x citron). The somatic hybrid results from total addition of the parental species without sexual recombination and it displays at quantitative level a dominance of lemon higher than for Volkamer lemon arising from sexual recombination. One

should hypothesize (i) that Volkamer lemon lost (due to sexual segregation) some alleles implied in the depression of carotenoids accumulation in *C. limon* or (ii) that allotetraploidy leads to new profiles of gene regulation unfavorable to carotenoid accumulation. The analysis of expression of the genes of the carotenoid biosynthesis pathway was undertaken to have a better understanding of the specific phenotype of the allotetraploid somatic hybrid.

Inheritance of the expression of the genes of the carotenoid biosynthetic pathway

The expression of the gene of the biosynthesis pathway was analyzed from fruit harvested at maturity (225 DAA). Indeed, previous studies [19-21] have demonstrated at this stage a good relationship between differential gene expression and interspecific carotenoid content diversity.

Significant differences were found between the two parents for 6 genes over the 8 analyzed (Table 3). Only *CitPds* and *CitNced* were similar for the two parents while lower expression was observed for lemon for the 6 other genes. The stronger variation levels were observed for *CitDxs* and *CitZds* with approximately 4 times more expression in mandarin than lemon. The corresponding 2 enzymes are involved in the first steps of the carotenoid biosynthetic pathway: the MEP pathway leading to GGPP for DXS and the formation of lycopene from ζ -carotene for ZDS. For the other genes the expression for mandarin was approximately 2 times the one for lemon. This interspecific differentiation is similar to the results described by Fanciullino. [28] in a comparison between sweet orange and lemon. Kato *et al.* [20] observed also difference in expression levels of genes that participate to synthesis of β,β -xanthophylls, between Satsuma mandarin and Lisbon lemon. Levels of gene expression in Lisbon lemon were much lower than those in Satsuma mandarin and may be correlated with low concentration of β,β -carotenoids in the juice sacs of Lisbon lemon [20].

In addition to *CitPds* for which no difference was found between the 3 genotypes, the gene expression of the somatic hybrid was found similar to mandarin for *CitHyb* and *CitZep*. For *CitPsy*, *CitDxs*, *CitLcyb* and *CitZds* the somatic hybrid presented an intermediary gene expression between mandarin and lemon. Additive gene expression was tested comparing the expression for the somatic hybrid and a theoretical midparent (Table 3). Additivity was observed for *CitPsy*, *CitPds*. Partial dominance of mandarin was observed for *CitHyb* and *CitZep* while lemon dominance occurred for *CitDxs*, *CitZds* and *CitLcyb*. Moreover a transgressive expression of *CitNced1* was observed for the allotetraploid hybrid. Non additive

gene expression has been described during the last years for several allotetraploid models. Gene silencing is part of the origin of non additivity. It is generally considered that a 'genomic shock phenomenon' as proposed by McClintock (1984) [35], occurs rapidly in interspecific hybrids and allopolyploids, resulting in demethylation of retroelements, relaxation of imprinting genes, and silencing and activation of homeologous genes, including rRNA genes subjected to nucleolar dominance [36]. RNA interference, action of siRNAs and miRNAs and their implication in gene regulation, are also good candidates to explain non-additive gene expression [37]. Recent quantitative or semiquantitative analyses of gene [5, 38-40] and proteome [41] expression also demonstrate that interspecific hybridization and allotetraploidy leads to non additive expression at the transcriptome and proteome level. The neoregulation of the genome should be much more related with interspecificity than polyploidisation. Indeed several studies as in *Spartina* [42], *Helianthus* [39] and *Arabidopsis* [5] reveals that neoregulation of genome expression occurs in interspecific crosses within a same ploidy level, while autopolyploidisation affect slightly the genome [5, 43] or proteome [44] expressions. In addition of epigenetic change induced by the 'genomic shock', allopolyploidy induces the juxtaposition and interaction of divergent homeologous regulatory networks leading to new *cis*- and *trans*-acting effects on gene expression [36, 45]. In our study, the genes of the carotenoid biosynthetic pathway displaying non-additivity were expressed for all the genotypes with partial dominance of mandarin expression for two gene and lemon expression for three genes. A slight neo-regulation due to such interactions of different regulatory network is more probable than a dramatic epigenetic change. The transgressive expression of *Nced1* should be related with the recent observation of Saleh et al (2008) suggesting that autotetraploid citrus should produced constitutively more ABA than their diploid genitor. Under this hypothesis the transgressive expression of *Nced1* should then be directly associated with tetraploidy *per se* rather than the interaction of two homeologous genomes.

Relations between gene expression and phenotype of the allotetraploid hybrid

The somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* had all the functional alleles from mandarin and thus the potential to produce all carotenoid compounds found in mandarin. However the total carotenoid content is about ten fold lower in the allotetraploid somatic hybrid juice sac than in the mandarin ones leading to global quantitative dominance of lemon at phenotypical level. Regarding gene expression, a dominance of the low parent (lemon) was

observed for three of the genes of the upper part of the biosynthetic pathway: *CitDxs*, *CitZds* and *CitLcy-b*. In a comparison between lemon and sweet orange (being part of the mandarin cluster for carotenoid content; [18]) Fanciullino [28] observed an expression of *CitDxs* 4.7 time higher in sweet orange than lemon. While a cordoned expression was described in tomato between *Dxs* and *Psy* [46], Fanciullino [28] and Kato [20] mentioned equivalent expression of *Psy* for lemon and sweet-oranges. These results leaded Fanciullino [28] to conclude that the lower expression of *Dxs* was a key component of the lower carotenoid content in lemon. The role of this gene in carotenoid biosynthesis pathway regulation was previously empathized in tomato [46]. The dominance of lemon under expression for *CitDxs* in the somatic hybrid, while additivity was observed for *CitPsy*, suggest that a down regulation of the Methylerythritol phosphate pathway should be an important component of the low carotenoid content in the somatic hybrid juice sacs. Further limitation of lycopene synthesis from ζ -carotene and β -carotene from lycopene associated respectively with down regulation of *CitZds* and *CitLcy-b* should enforce the low production of carotene and β,β -xanthophylls. The lower decrease of carotenoid content between mandarin and the somatic hybrid was observed for β -cryptoxanthin consistently with the dominance of *CitHy-b* mandarin expression in the allotetraploid. Indeed *CitHy-b* is implied in the formation of β -cryptoxanthin from β -carotene. The over expression of *CitNced* genes was considered by Kato et al. [21] as an other key of low accumulation of carotenoid and absence of *cis*-violaxanthin in lemon fruits. The somatic hybrid presents a transgressive expression of *CitNced1*. The utilization of *cis*-violaxanthin, the final product of the carotenoid biosynthetic pathway, to synthesize ABA should also contribute greatly to the low contents of carotenoid in the somatic hybrid juice sacs.

Conclusion

In conclusion, we report in the present paper the first attempt to analyze phenotypic inheritance in an allotetraploid somatic hybrid in relation with functional genomic. Carotenoid biosynthesis pathway and an allotetraploid hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* have been chosen as model due to the strong phenotypical differentiation of the two parental species and the previous knowledge on molecular basis of interspecific phenotypical differentiation. Mandarin was found much more rich in carotenoid content than lemon both at qualitative (7 compounds for mandarin and 2 for lemon) than quantitative level (total carotenoid about 60 times higher in mandarin). The juice sac of the somatic hybrid contain the

same components than mandarin but at very low level leading to conclude for mandarin dominance at qualitative level and lemon dominance at quantitative level. It is proposed that the presence of the whole mandarin genome in the somatic hybrid ensure the complete set of functional alleles to produce all the carotenoid compounds. Dominance of lemon for *CitDxs*, *CitZds* and *CitLcyb* may limit the carotenoid biosynthesis in the somatic hybrid while a transgressive expression of *CitNced1* that use xanthophylls (Violaxanthin, neoxanthin) to produce ABA may lead to a high consumption of the synthesized carotenoid. Thus, we make the hypothesis that the novel phenotype of this allotetraploid hybrid results from (i) a complete set of functional alleles, (ii) an under production of the precursor of the pathway and first carotenoid molecules and (iii) an over production of ABA as final product of the carotenoid biosynthesis pathway. Analysis with the 20K microarrays developed by the Spanish consortium for Citrus genomic [47] are currently conducted to analyze more globally the inheritance of gene expression in this allotetraploid hybrid.

Acknowledgments

We thank the *Collectivité Territoriale de Corse* for granting this study.

References

1. Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O: **Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2000, **36**(6):434-449.
2. Ollitrault P, Guo W, Grosser JW: **Somatic hybridization.** In: *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. 2007: 235-260.
3. Adams KL, Percifield R, Wendel JF: **Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid.** *Genetics* 2004, **168**:2217-2226.
4. Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B: **Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids.** *Plant Cell* 2000, **12**(9):1551-1567.
5. Wang JL, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang HM, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L *et al*: **Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids.** *Genetics* 2006, **172**(1):507-517.

6. Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ: **Stochastic and epigenetic changes of gene expression in Arabidopsis polyploids.** *Genetics* 2004, **167**:1961–1973.
7. Lee HS, Chen ZJ: **Protein-coding genes are epigenetically regulated in Arabidopsis polyploids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(12):6753-6758.
8. Kashkush K, Feldman M, Levy AA: **Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid.** *Genetics* 2002, **160**(4):1651-1659.
9. Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF: **Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(8):4649-4654.
10. Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V *et al*: **Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids.** *Trends Genet* 2003, **19**(3):141-147.
11. Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y: **Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus.** *Plant Breed Rev* 2008, **30**:323-352.
12. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM: **Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent.** *J Agric Food Chem* 2003, **51**(20):6006-6013.
13. Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM: **Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit.** *J Agric Food Chem* 2005, **53**(6):2224-2230.
14. Gancel AL, Grimplet J, Sauvage FX, Ollitrault P, Brillouet JM: **Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids.** *J Agric Food Chem* 2006, **54**(17):6212-6218.
15. Bassene JB, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y: **Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid** *J Agric Food Chem* Submitted.
16. Hirschberg J: **Carotenoid biosynthesis in flowering plants.** *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**(3):210-218.
17. Sandmann G: **Carotenoid biosynthesis and biotechnological application.** *Arch Biochem Biophys* 2001, **385**(1):4-12.

18. Fanciullino AL, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P: **Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors.** *J Agric Food Chem* 2006, **54**(12):4397-4406.
19. Fanciullino AL, Dhuique-Mayer C, Luro F, Morillon R, Ollitrault P: **Carotenoid biosynthetic pathway in the Citrus genus: number of copies and phylogenetic diversity of seven genes.** *J Agric Food Chem* 2007a, **55**(18):7405-7417.
20. Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M: **Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit.** *Plant Physiol* 2004, **134**(2):824-837.
21. Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Okuda H, Yano M: **The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit.** *J Exp Bot* 2006, **57**(10):2153-2164.
22. Huh JH, Kang BC, Nahm SH, Kim S, Ha KS, Lee MH, Kim BD: **A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum spp.*).** *Theor Appl Genet* 2001, **102**(4):524-530.
23. Olsen JA: **Provitamin A function of carotenoid. The conversion of beta-carotene into vitamin A.** *J Nutr* 1989, **119**:105-108.
24. Rodriguez-Concepcion M, Boronat A: **Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics.** *Plant Physiol* 2002, **130**(3):1079-1089.
25. Alos E, Cercos M, Rodrigo MJ, Zacarias L, Talon M: **Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants.** *J Agric Food Chem* 2006, **54**(13):4888-4895.
26. Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT: **Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs).** *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2006, **112**(8):1519-1531.
27. Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E: **Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers.** *Theor Appl Genet* 2000, **100**(8):1155-1166.

28. Fanciullino AL: **Etude des déterminants génétiques et moléculaires de la variabilité des compositions en caroténoïdes au sein du genre Citrus**. Corte: Université de Corse-Pascal Paoli; 2007b.
29. Kim I, Ko K, Kim C, Chung W: **Isolation and characterization of cDNAs encoding beta -carotene hydroxylase in Citrus**. *Plant Science* 2001, **161**(5):1005-1010.
30. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, d'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A *et al*: **Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization**. *Cah Agric* 2000, **9**(3):223-236.
31. Dhuique-Mayer C, Caris-Veyrat C, Ollitrault P, Curk F, Amiot MJ: **Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area**. *J Agric Food Chem* 2005, **53**(6):2140-2145.
32. Manning K: **Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation**. *Anal Biochem* 1991, **195**(1):45-50.
33. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual**. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989: xxxviii + 1546 pp.
34. Fanciullino AL, Cercos M, Dhuique-Mayer C, Froelicher Y, Talon M, Ollitrault P, Morillon R: **Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (Citrus sinensis) differing in flesh fruit color**. *J Agric Food Chem* 2008, **56**(10):3628-3638.
35. McClintock B: **The significance of responses of the genome to challenge**. *Science* 1984, **226**:792–801.
36. Chen ZJ: **Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids**. *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:377-406.
37. Chen M, Ha M, Lackey E, Wang J, Chen ZJ: **RNAi of met1 Reduces DNA Methylation and Induces Genome-Specific Changes in Gene Expression and Centromeric Small RNA Accumulation in Arabidopsis Allopolyploids**. *Genetics* 2008.
38. Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J: **Duplicate gene expression in allopolyploid Gossypium reveals two temporally distinct phases of expression evolution**. *BMC Biology* 2008, **6**(1):16.
39. Lai Z, Gross BL, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH: **Microarray analysis reveals differential gene expression in hybrid sunflower species**. *Mol Ecol* 2006, **15**(5):1213-1227.

40. Udall JA, Swanson JM, Nettleton D, Percifield RJ, Wendel JF: **A novel approach for characterizing expression levels of genes duplicated by polyploidy.** *Genetics* 2006, **173**(3):1823-1827.
41. Albertin W, Alix K, Balliau T, Brabant P, Davanture M, Malosse C, Valot B, Thiellement H: **Differential regulation of gene products in newly synthesized Brassica napus allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization.** *BMC Genomics* 2007, **8**(56):(21 February 2007).
42. Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF: **Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in Spartina (Poaceae).** *Mol Ecol* 2005, **14**(4):1163-1175.
43. Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR *et al*: **Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization.** *Genetics* 2007, **176**(4):2055-2067.
44. Albertin W, Brabant P, Catrice O, Eber F, Jenczewski E, Chevre AM, Thiellement H: **Autopolyploidy in cabbage (Brassica oleracea L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues.** *Proteomics* 2005, **5**(8):2131-2139.
45. Landry CR, Hartl DL, Ranz JM: **Genome clashes in hybrids: insights from gene expression.** *Heredity* 2007, **99**(5):483-493.
46. Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A: **Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase.** *Plant J* 2000, **22**(6):503-513.
47. Terol J, Conesa A, Colmenero JM, Cercos M, Tadeo F, Agusti J, Alos E, Andres F, Soler G, Brumos J *et al*: **Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance.** *BMC Genomics* 2007, **8**(31):(25 January 2007).
48. Mouhaya W: **Caractérisation physiologique et moléculaire de la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tetraploïdes d'agrumes.** Corte: Université de Corse-Pascal Paoli; 2008, 202 p.

Figure 1. Carotenoid biosynthetic pathway in fruit chromoplasts (from Fanciullino *et al.*, 2008). DXS, deoxyxylulose 5-phosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, ζ -carotene desaturase; CRTISO, carotenoid isomerase; LCY-e, lycopene ϵ -cyclase; LCY-b, lycopene β -cyclase; HY-b, β -carotene hydroxylase; HY-e, ϵ -carotene hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NSY, neoxanthin synthase; NCED, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase.

Figure 2. Fruits of Eureka lemon (left), allotetraploid hybrid (middle) and Willow leaf mandarin (right) differing in their flesh color.

Figure 3. Dendrogram constructed according to Ward method using Euclidean distance from carotenoid content in fruit pulp of Willow leaf mandarin, allotetraploid hybrid and Eureka lemon.

Table 1: Primers used for gene expression analysis by real time RT-PCR

Gene	Primer	PCR product size	Reference
<i>Dxs</i> Forward	5'-GTGTTTTCAACACACCTGACG-3'	120 pb	[34]
<i>Dxs</i> Reverse	5'-AAGCCCCGAAGTCTTCCTCAT-3'		
<i>Psy</i> Forward	5'-GGTCGTCCATTTGATATGCTTG-3'	111 pb	[34]
<i>Psy</i> Reverse	5'-CCTAAGGTCCATCCTCATTCCT-3'		
<i>Pds</i> Forward	5'-GACAAGGAAGGGTTTCTGTCC-3'	134 pb	[34]
<i>Pds</i> Reverse	5'-GCTTAGAAGGACGAGGAGAAG-3'		
<i>Zds</i> Forward	5'-CGATCCTTACATGCCCTTAC-3'	145 pb	[34]
<i>Zds</i> Reverse	5'-AGGTCCCTCACGGTACAAAG-3'		
<i>Lcy-b</i> Forward	5'-CCCATGTATGACCCATCAAAG-3'	130 pb	[34]
<i>Lcy-b</i> Reverse	5'-TGGGAGATGGATCAATCGAG-3'		
<i>Hy-b</i> Forward	5'-GGTGCTGGACTTGGCATTAC-3'	120 pb	[34]
<i>Hy-b</i> Reverse	5'-AGCGACTCTCCGGAATAAG-3'		
<i>Zep</i> Forward	5'-TTGGTTGATGGGATTTCTGG-3'	134 pb	[34]
<i>Zep</i> Reverse	5'-TCCCCAACCGCTTTAGCTAG-3'		
<i>Nced1</i> Forward	5'-GACCAGCAAGTGGTGTTCAA-3'	163 pb	[48]
<i>Nced1</i> Reverse	5'-AGAGGTGGAAACAGGAGCAA-3'		

Table 2: Carotenoids content (milligrams per liter)

Genotypes	Phytoene	Phytofluene	β -carotene	β -cryptoxanthin	lutein	Zeaxanthin	Violaxanthin	Total Carotenoid
Willow leaf mandarin	1.62 ^a \pm 0.13	2.78 ^a \pm 0.21	1.47 ^a \pm 0.12	17.66 ^a \pm 1.15	0.96 ^a \pm 0.05	1.29 ^a \pm 0.03	3.74 ^a \pm 0.15	29.52 \pm 2.27
Eureka lemon	-	-	0.11 ^b \pm 0.01	0.34 ^c \pm 0.02	-	-	-	0.45 \pm 0.11
Allotetraploid hybrid	0.08 ^b \pm 0.01	0.27 ^b \pm 0.03	0.06 ^b \pm 0.01	2.48 ^b \pm 0.06	0.05 ^b \pm 0.01	0.08 ^b \pm 0.01	0.12 ^b \pm 0.02	3.14 \pm 0.33

Data are means \pm SE of three measurements, different letters in the same column indicate significant differences for carotenoids content ($\alpha = 0.05\%$)

Table 3: mRNA levels

Genotypes	<i>CitDxs</i>	<i>CitPsy</i>	<i>CitPds</i>	<i>CitZds</i>	<i>CitLcy-b</i>	<i>CitHy-b</i>	<i>CitZep</i>	<i>CitNced1</i>
Willow leaf mandarin	0.16 ^a \pm 7E-4	0.38 ^a \pm 1E-3	0.05 \pm 5E-4	0.10 ^a \pm 1E-3	0.005 ^a \pm 2E-5	3.39 ^a \pm 0.2	0.085 ^a \pm 6E-4	0.003 ^a \pm 3E-5
Eureka lemon	0.04 ^c \pm 1E-3	0.22 ^c \pm 1E-3	0.06 \pm 6E-4	0.02 ^c \pm 4E-4	0.002 ^c \pm 2E-5	1.49 ^b \pm 0.1	0.055 ^b \pm 3E-4	0.003 ^a \pm 2E-5
Allotetraploid hybrid	0.07 ^b \pm 1E-3	0.30 ^b \pm 1E-3	0.05 \pm 6E-4	0.05 ^b \pm 4E-4	0.003 ^b \pm 1E-5	3.11 ^a \pm 0.1	0.075 ^a \pm 1E-4	0.005 ^b \pm 2E-5
Mid parent value	0.10	0.30	0.05	0.06	0.004	2.44	0.070	0.003

Data are means \pm SE of three measurements, different letters in the same column indicate significant differences of mRNA levels ($\alpha = 0.05\%$)

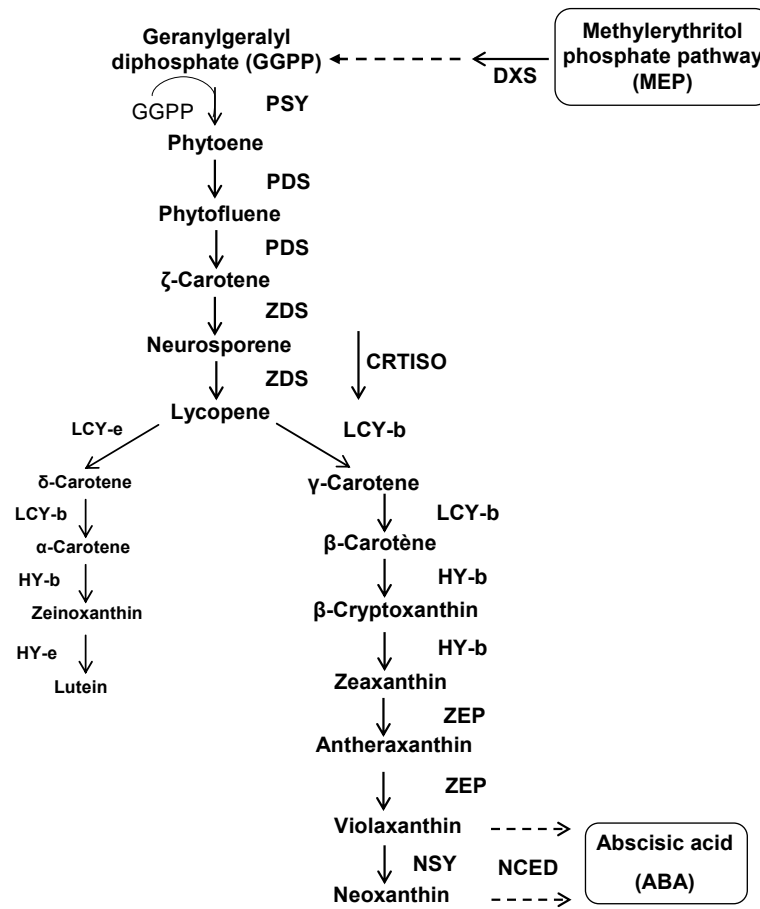


Figure 1



Figure 2

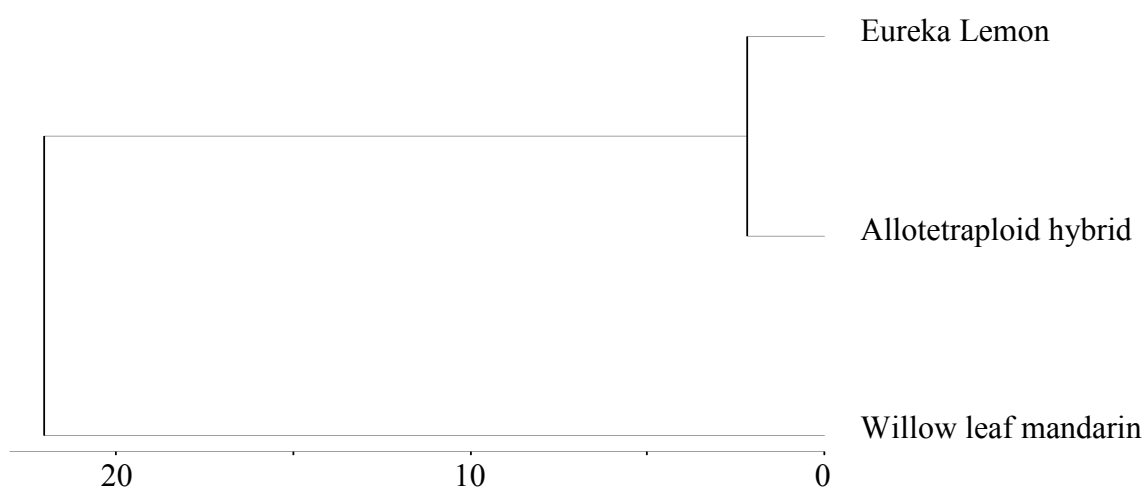


Figure 3

III.8. REGULATION NON ADDITIVE DE L'EXPRESSION DES GENES CHEZ L'HYBRIDE SOMATIQUE ALLOTETRAPLOÏDE

III.8.1. Résumé de l'article

Introduction

Les plantes polyploïdes présentent souvent de nouveaux phénotypes, sortant de la fourchette de variabilité du pool génique diploïde. Chez les agrumes, les programmes d'hybridation somatiques ont permis la production de plusieurs centaines d'hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques allotétraploïdes. Ces génotypes représentent des modèles intéressants pour étudier les effets immédiats de l'allopolyploidisation sur la régulation de l'expression des gènes. Cette étude a pour objectif de déterminer si le phénotype particulier de l'hybride allotétraploïde interspécifique WLM + EUR 4x (*C. reticulata* cv 'Willow leaf' + *C. lemon* cv 'Eureka'), marqué par une coexistence de caractères dominants, codominants et transgressifs, est associé à une expression non additive des deux génomes diploïdes parentaux.

Matériel et méthodes

L'expression globale des gènes est analysée à partir du transcriptome de la pulpe des fruits de l'hybride allotétraploïde et de ses parents (*C. reticulata* cv 'Willow leaf' + *C. lemon* cv 'Eureka'). L'étude est effectuée par hybridation du transcriptome de la pulpe des fruits sur un cDNA microarray de 20 K. Les 3 répétitions biologiques pour chaque génotype sont comparées à une référence composée d'un mélange équimolaire de tous les ARN. Le microarray est constitué de 21081 unigenes et a été développé dans le cadre du projet de génomique fonctionnelle des agrumes (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) à partir d'une large base d'ESTs Clémentinier.

Résultats et discussions

Environ 4% du transcriptome montre une divergence entre les deux parents avec 212 et 160 gènes surexprimés chez *C. reticulata* et *C. limon* respectivement. La majeure partie des gènes montrant une différenciation interspécifique d'expression entre le mandarinier et le citronnier, présente un profil d'expression non additif chez l'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x, et la plupart d'entre eux sont réprimés. Nous avons également observé que la quasi-

totalité des gènes sous-exprimés chez le mandarinier comparé au citronnier sont réprimés chez l'allotétraploïde. Toutefois, lorsque les gènes sont surexprimés chez le mandarinier par rapport au citronnier, les expressions des gènes de l'allotétraploïde ont une distribution beaucoup plus équilibrée de part et d'autre de la valeur du parent moyen, avec la présence de cas de surexpression transgressive. Ces résultats indiquent une forte dominance du transcriptome du mandarinier sur celui du citronnier. La régulation non additive des gènes est impliquée dans des voies biologiques très variées et les protéines codées présentent différentes localisations cellulaires. Un enrichissement significatif a été observé que pour les catégories " processus métabolique secondaire", "photosynthèse" et "photosystème I et II" dans le groupe des gènes surexprimés chez le citronnier. Nos résultats sont cohérents avec les précédentes observations phénotypiques et du protéome allant en faveur d'une dominance globale du mandarinier sur toutes les autres espèces parentales lors de l'hybridation somatique chez les agrumes.

III.8.2. Article

**Titre: Non additive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid
between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm**

**BASSENE, J. B.; ANCILLO, G.; FERRER, R. M.; FROELICHER, Y.;
OLLITRAULT, P.**

Article à soumettre (*Journal of Heredity*)

Non additive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm.

*Jean Baptiste Bassene*¹, *Gema Ancillo*², *Rosa Mar Ferrer*², *Yann Froelicher*¹ and *Patrick Ollitrault*^{2,3*}

¹CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), UPR Multiplication végétative, F-20230 San Giuliano, France.

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Centro de *Proteccion vegetal y biotecnologia*, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

³ Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France.

**Author to whom correspondence should be addressed. CIRAD, UPR “Amélioration génétique d’espèces à multiplication vegetative”, Centro de Proteccion vegetal y biotecnologia, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) - 46113 - Moncada - Valencia Spain. Fax: +(34) 963 424 106. E-mail: patrick.ollitrault@cirad.fr*

Abstract

Polyloid plants often present new phenotypes, outgoing of the ranges of variability of the diploid gene pool. *Citrus* somatic hybridization programs allowed to produce several hundreds of interspecific and intergeneric allotetraploid hybrids. These genotypes represent interesting models to study immediate effect of allopolyploidisation on the regulation of gene expression. We report here, genome-wide gene expression analysis on fruit pulp of a *Citrus* interspecific somatic allotetraploid between *C. reticulata* cv 'Willow leaf' + *C. limon* cv 'Eureka' (WLM + EUR), using a *Citrus* 20 K cDNA microarray. About 4% transcriptome divergence was observed between the two parental species and 212 and 160 genes were highly expressed in *C. reticulata* and *C. limon* respectively. Major part of genes displaying interspecific expression divergence between mandarin and lemon had non additive expression pattern in the WLM + EUR allotetraploid hybrid, and most of them displayed a down regulation. We observed that genes underexpressed in mandarin compared to lemon are also repressed in the allotetraploid. However, when genes are overexpressed in mandarin compared to lemon, the allotetraploid genes expressions distribution was much more equilibrated with also presence of transgressive over expression. These results suggested a strong global dominance of the mandarin transcriptome. The nonadditive gene regulation is involved in various biological pathways and concerned different cellular components. Significant enrichment was found for the categories "secondary metabolic process", "photosynthesis" and "photosystem I and II" only for genes over expressed in lemon. Our results are consistent with our previous phenotypic and proteomic observations leading to a global dominance of mandarin over all other parental species in *Citrus* somatic hybridization schemes.

Keywords: Citrus, somatic hybrid, allotetraploid, cDNA microarrays, gene expression, genome regulation, transcriptome.

INTRODUCTION

Polyploidization is a prominent mechanism of speciation in flowering plants and has a strong impact on plant species diversity (Grant 1981; Soltis and Soltis 1993; Wendel and Doyle 2005). Polyploid plants often present new phenotypes, outgoing of the ranges of variability of the diploid gene pool (Osborn et al. 2003) and it is generally considered that allopolyploidy confer an evolutionary advantage over their progenitor (Wendel and Doyle 2005; Chen 2007; Salmon et al. 2005). Genomic reorganization, independent evolution and subfunctionalization of duplicated genes (Adams et al. 2003; Lynch and Force 2000) as well as fixed heterozygosity (Comai 2005) are important elements of the evolution of polyploid populations. Recent studies also demonstrated that besides structural changes (Madlung et al. 2005; Pontes et al. 2004), important modifications of gene expression occur immediately after allopolyploidisation events (Adams et al. 2004; Comai et al. 2000b; Wang et al. 2004; Wang et al. 2006). Gene silencing is frequent in allotetraploid. It varies between 1 and 5% in corn allopolyploids (Kashkush et al. 2002) and between 2.5% to 11% in allopolyploids between *Arabidopsis thaliana* and *A. arenosa* (Wang et al. 2004; Lee and Chen 2001), to reach 25% in allotetraploids cotton plants (Adams et al. 2003). Several studies suggest that these variations of expression are repeatable for particular genes. Thus, in *Arabidopsis* a same set of 3 genes is affected in four allopolyploid lines arising from independent events of polyploidisation (Wang et al. 2004). However in the same study gene silencing appears to be stochastic in other part of the genome. In cotton, very similar skews are observed for several recent allotetraploid artificial hybrids and natural allotetraploid cotton plants whose polyploidisation event goes back to more than 1 million years. Moreover in cotton the neoregulation of the genome appears to be organ-specific (Adams et al. 2003; Adams et al. 2004).

In most of these published studies, the recent allotetraploid plants arise from sexual crossing having potential intrafamily variability in case of non total homozygosity of the parental lines. In this framework, somatic hybrids should be interesting models to study immediate effect of allopolyploidisation on the regulation of gene expression. Since two decades somatic hybridization became an important tool for citrus breeding and several hundreds of interspecific and intergeneric allotetraploid hybrids have been synthesized (Ollitrault et al. 2000; Ollitrault et al. 2007 for review). For rootstock, it allows cumulating all dominant characters of complementary heterozygous parents. It has also been used widely for the diversification of the tetraploid gene pool to be used for triploid citrus breeding (Ollitrault et al. 2008). Allotetraploid citrus from somatic hybridization displays some transgressive

morphological vegetative traits (leaf thickness, stomate density and size, etc) similar to autotetraploid arising from chromosome doubling of nucellar cells (Ollitrault et al. 2008 for review) that can be associated with tetraploidy *per se*. However inheritance of others traits appears clearly linked with the parental combinations with codominance or dominance of one or other parents according to the considered traits. In a study on leaf volatile compounds of seven citrus somatic allotetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin as their common parent (Gancel et al. 2003), including Willow leaf + Eureka lemon hybrid, a systematic dominance of mandarin characters was observed. It was particularly marked regarding the absence of monoterpene aldehydes and monoterpene alcohols and the very low level of sesquiterpene hydrocarbons, sesquiterpene alcohols, and sesquiterpene aldehydes (β - and α -sinensals) in all hybrids while these compounds were found at high concentration for the non mandarin parents. Moreover some specific compounds of Willow leaf mandarin such as methyl N-methylanthranilate were found in all hybrids. Such dominance of mandarin traits was also observed for the leaf proteome of two allotetraploid somatic hybrids combining willow leaf mandarin (*Citrus reticulata*) with mexican lime (*C. aurantifolia*) and kumkat (*Fortunella margarita*) analyzed by 2-D electrophoresis. The two allotetraploid hybrids were found closer to their mandarin parent than to their other parents in terms of presence/absence of protein spots as well as at a quantitative expression level (Gancel et al. 2006). In other interspecific combinations such as *C. sinensis* + *C. paradisi* codominance was observed for aromatic compounds (Gancel et al. 2005).

More recently, Bassene et al. (submitted) selected the allotetraploid *C. reticulata* cv 'Willow leaf' + *C. limon* cv 'Eureka' as model for the analysis of phenotypical inheritance of fruit quality traits in allotetraploid citrus somatic hybrids. Indeed the two parents displayed a very strong differentiation for primary and secondary metabolites profiles as well as for pomological characters. Strong dominance of lemon was found for acid compounds, partial dominance of lemon was found for sucrose and glucose while dominance of mandarin was observed for fructose and most of the aromatic compounds except methyl N-methylanthranilate (Bassene et al. Submitted). Some morphological characteristics of the fruits such as the shape and colour were closer to mandarin while codominance was observed for other traits such as fruit size and diameter, number of seeds and number of embryos/seed (Bassene 2009).

It is widely accepted (Federici et al. 1998; Herrero et al. 1996; Nicolosi et al. 2000) that mandarin (*C. reticulata*), pummelo (*C. maxima*) and citron (*C. medica*) are the 3 basic taxa from which originated the cultivated species such as *C. sinensis* (sweet orange), *C. aurantium*

(sour orange), *C. paradisi* (grapefruit) and *C. limon* (lemon). This latter species is a probable direct hybrid between *C. aurantium* and *C. medica* (figure 1) (Nicolosi et al. 2000). Considering that *C. aurantium* results from hybridization between the *C. reticulata* and *C. maxima* (Nicolosi et al. 2000) it should be considered that *C. limon* is a mosaic of genome regions in heterozygosity between *C. medica* and *C. reticulata* and regions in heterozygosity between *C. medica* and *C. maxima*. Thus the specific allelic dosis along the genome of the allotetraploid *C. reticulata* + *C. limon* somatic hybrid may be 3 *C. reticulata* + 1 *C. medica* or 2 *C. reticulata* + 1 *C. maxima* + 1 *C. medica*.

The main objective of the present paper is to analyze if the novel phenotype of this complex three way tetraploid interspecific hybrid, displaying a mix of dominant, codominant and transgressive characters as described in previous works (Gancel et al. 2003; Bassene et al. Submitted; Bassene 2009), is associated with non additive expression of the two diploid parental genomes. The study is conducted by hybridization of fruit pulp transcriptome on a genome-wide 20 K cDNA microarray developed under the Citrus Functional Genomic Project (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>; (Martinez-Godoy et al. 2008)) from a very large clementine ESTs database (Terol et al. 2007).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The study was conducted on fruits of Willow leaf mandarin SRA 133 (*Citrus reticulata* Blanco.), Eureka lemon SRA 4 (*Citrus limon* (L.) Burm.), and their somatic allotetraploid called WLM + EUR (*Citrus reticulata* Blanco) + (*Citrus limon* (L.) Burm.). WLM + EUR was produced by symmetric protoplast electrofusion (Ollitrault et al. 2000). Molecular markers (SSRs) analysis demonstrated the complete addition of the 2 parental nuclear genomes combined with chloroplasts and mitochondria of mandarin (Bassene et al. Submitted).

The somatic allotetraploid and the two parents were all grafted onto volkameriana rootstock (*Citrus limonia* Obs.) and three trees of each genotype were randomly planted in the same field at the Station de Recherche Agronomiques (INRA/CIRAD) in San Giuliano (Corsica, France) in 2002. For each genotype, 4 fruits per tree were harvested at maturity [225 days after anthesis (DAA)] from three individual trees, in February 2007.

RNA extraction and microarray hybridisation

Total RNA was extracted from fruits [225 days after anthesis (DAA)] according to the protocol described by Ancillo *et al.* (2007), except that the high pH of the lemon fruit homogenates was neutralized by addition of NaOH up to pH-neutral. Extracted RNA was then used in an amplification reaction with the AminoAllyl Message Amp™ aRNA Amplification kit (Ambion) following manufacturer's instructions. 7.5 µgr of UTP-aminoallyl-amplified RNA were labelled using Cy3 or Cy5 dye (GE Healthcare).

Fruits were randomly collected from three different field trees. Three biological replicates for each genotype were generated and compared with a global reference, generated from an equimolar mix of amplified RNAs from each of the 9 trees.

A genome-wide 20K cDNA microarray developed under the Citrus Functional Genomic Project (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) was used. The microarray includes 21,081 putative unigenes of citrus (Martinez-Godoy et al. 2008). Microarray hybridisation and washing were performed as described by Martinez-Godoy *et al.* (2008). After hybridization and wash, slides were scanned at 532 nm for the Cy3 and 635 nm for the

Cy5 dyes, with a GenePix 4000B scanner (Axon Molecular Devices), at 10 nm resolution and 100% laser power. Photomultiplier tube voltages were adjusted to equal the overall signal intensity for each channel, to increase signal-to-noise ratio, and to reduce number of spots with saturated pixels. Spot intensities were quantified using GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices). Spots with a net intensity in both channels lower than the median signal background plus twice standard deviations were removed as low signal spots

Microarray data analysis

Data were global median normalized using GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices) so that the median of the median ratios of every valid spot in the slide is equal to 1. Only probes with valid data in all slides were considered for further analysis (9376 spots).

To detect differentially expressed genes data were analysed with the SAM package (Tusher et al. 2001), using multiclass comparison with a false discovery rate (FDR) of 4.18% with no fold-change cut-off. The differentially significant expressed genes were clustered in self-organizing maps (SOM) (Kohonen 1990) with Euclidean squared similarity metrics using the GEPAS interface (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>, (Herrero et al. 2003)). The means and standard deviations from each group for each species were normalized to the median of the expression in WLM samples.

Gene lists were further analysed with Blast2GO (Conesa et al. 2005) to find differential distributions of gene ontology (GO) term between statistically differential genes in each SOM and the rest of genes in the microarray.

RESULTS

A cDNA microarray containing 21,081 putative unigenes was used to analyse the gene expression profile of the Willow leaf + Eureka lemon allotetraploid hybrid and its two diploid parental genomes. Total RNA was extracted from fruit pulp (225 DAA), amplified, labeled, and hybridized to the microarray. Three biological replicates were analyzed per species using a global reference experimental design. After quality analysis, 9,376 spots (unigenes) were considered as valid for further analyses. Expression levels were analyzed in a multiclass response using significance analysis of microarray (SAM, (Tusher et al. 2001)). In total, 372 differentially expressed genes were statistically significant, with a false discovery rate (FDR) of 4.18%.

Differentially expressed genes statistically significant were grouped according to self organizing maps (SOM, (Kohonen 1990)). To reflect biological differences in gene expression, data were normalized to the median expression of Willow leaf samples. Two global pattern of gene expression were found among these genes. One corresponding to those genes repressed in Eureka lemon with respect to the ones of mandarin and a second one corresponding to the over-expressed ones in Eureka lemon compared to Willow leaf mandarin. The first pattern corresponds to 212 genes (group 1) and the second one to 160 genes (group 2). To compare the global expression level of this group of genes in the two parents and the hybrid, the means of the expression data (logarithmic data) from each group for each species were normalized to the median of the expression in Willow Leaf Mandarin samples. Expression levels in the hybrid are intermediate between the two parents (figure 2 A and B) for the two groups, however much more close to those of Willow leaf mandarin for the group 2 (figure 2B).

Transgressive expression (over mandarin expression) of the somatic hybrid was observed for 34 genes of the group 1 while no transgressive expression was observed for the group 2. After removing these 34 transgressive genes from group 1, we have analysed more finely the distribution of gene expression of the somatic hybrid between the gene expressions of its two parents. For each group, initial data of expression (before logarithmic transformation) were normalised to attribute a null value of gene expression for the parent with low expression and 1 to the parent with high expression. For the group 1 (over expression of mandarin) gene expressions of the allotetraploid are distributed between the two parents (figure 3A). However most of the genes display a non additive expression with an expression level lower to the

theoretical midparent value (0.5) with a medium value of 0.42. For the group 2 (over expression of lemon) the non additivity is generalised (figure 3B) with a very strong dominance of mandarin (low expression). Indeed no gene expression was found over 0.55 and the medium gene expression value is 0.09. Regarding the 34 genes with transgressive expression, they display an over expression distributed between 1.1 and more than 3 time the one of mandarin (figure 3C). Nine of them, displaying more than two fold the mandarin expression level. The medium value of this group is 2.13.

Considering all the genes displaying significant differentiation among the 3 genotypes, the transcriptome of the allotetraploid hybrid appears much more close to its mandarin parent than to its lemon one as it is clearly shown by the cluster analysis (UPGMA: Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean) based in Euclidian distances elaborated from the relative expression of the considered 372 genes (figure 4).

To examine whether any of the GO terms obtained in the gene groups identified by SOM, was enriched when compared with the whole microarray gene set as a reference, we apply the Fisher's test implemented in Blast2GO (Conesa et al. 2005). The genes were represented in various functional categories. In group 1, the genes attributed to the functional category "secretory pathway" (about 27%) are over the most represented, followed by the genes from the category "metabolic process", about 10% (figure 5A). The rest of the genes are distributed in different biological processes and represented about 7 to 2%. The category "secretory pathway" designed the process by which proteins are sorted to various destinations in the cell. No significant enrichment was found in this group compared with the reference distribution. Half of the genes from the group 1 encoded for proteins located in "plastid" (18%), "mitochondrion" (18%) and "cytoplasmic membrane-bounded vesicle" (15 %) but most of the cellular compartment are represented (figure 5B). The genes in the second group are also highly represented (27%) in the category "secretory pathway", whereas the other categories are equally represented (figure 6A). In this group, genes related "with secondary metabolic process", "photosynthesis" and "photosystem I and II" have been found significantly enriched compared to the reference distribution (table 1). The localisation of the proteins encoded by these genes are very similar to the group one (figure 6B). From the 34 transgressive genes, the category "vitamin E biosynthetic process" is significantly over represented with 12 % of the genes (figure 7A). Half of the proteins encoded by the genes in this group are located in the "mitochondrion" (17%), "nucleus" (17%) and "membrane" (14 %) and despite the low number of gene 11 cellular component are represented (figure 7B).

DISCUSSION

Due to the low availability of the field samples, experiment was carried out with three replicas what conducted to a data high variability in a way that the number of the obtained significant genes is probably underestimated. Nevertheless among the 9,376 spots (unigenes) considered as valid, 372 genes (4%) displayed significant differential gene expression between the 3 genotypes. After normalisation to the median expression of Willow leaf samples these genes were automatically clustered in two groups namely those which are overexpressed in mandarin vs lemon (group 1) and those which are overexpressed in lemon vs mandarin (group 2). So it appears that we have not identified genes with significant transgressive expression for the allotetraploid hybrid without gene expression differentiation between mandarin and lemon.

Non additivity is frequent among the genes displaying significant interspecific differences of expression

In this study of the transcriptome of citrus fruit pulp we detected 4% divergence between the two parental species and 212 and 160 genes were highly expressed in *C. reticulata* and *C. limon* respectively. It is less than the 15% observed by Wang et al. (2006) between *Arabidopsis thaliana* and *A. arenosa* in a microarray study of leaf transcriptome while to 10% divergence was found between maize lines (Swanson-Wagner et al. 2006).

According to the "additivity" hypothesis, newly-synthesized allopolyploids are supposed to display mid-parent expression patterns. By using microarray without allelic specificity, we cannot detect the situation where silencing of a locus is compensated by increased expression of its homeologous locus. Thus, we have to keep in mind that microarray analysis may underestimate the number of genes that display allelic differential expression between the allotetraploid line and the parents.

A majority of the genes displaying interspecific expression divergence between mandarin and lemon were found non additive in the WLM + EUR allotetraploid hybrid. It should be noted that, similar levels of transcriptional changes were observed in *Arabidopsis* (5.2% and 5.6% in two independent allotetraploid; (Wang et al. 2006)), polyploid taxa of *Senecio* (5%; (Hegarty et al. 2005)), wheat (7.7%; (He et al. 2003)), and cotton (5%; (Adams et al. 2003)). Moreover we found that most of the non additive gene displayed a down regulation. Indeed

after linear normalization, giving a value of 1 for the overexpressed parental genotype and 0 for the underexpressed one, the overall midvalue for the allotetraploid was 0.26 in spite of 0.5 for all the genes with significant expression variability between the three genotypes. These observations are similar to the results of Wang et al. (Wang et al. 2006) in a study of neo allotetraploid lines between *Arabidopsis arenosa* and *A. thaliana*. Indeed among the genes with non additive expression they observed that 76% and 65% were downregulated in two independent allotetraploid genotypes. They suggest that repression is a mode of nonadditive gene regulation in synthetic allotetraploids. Moreover as for the WLM+EUR allotetraploid they observed that most of the genes with non additive expression were part of the ones displaying significant differentiation of parental expression. Down regulation of interspecific hybrid genes was also observed for sunflower (Lai et al. 2006). However at interspecific level in maize, Swanson-Wagner (Swanson-Wagner et al. 2006) observed that only 22% of the differentially regulated genes exhibited nonadditive modes of gene expression. Moreover 181 of these 305 nonadditive genes exhibited high-parent dominance and only 23 exhibited lowparent dominance. It should be supposed that more systematic non additive behaviour of the gene with differential parental expression and downregulation are associated with interspecificity and global genetic divergences of parental genomes, leading to regulation incompatibilities (Landry et al. 2007).

In addition to the already cited species many deviation to additivity were found in synthetic allopolyploids, *Senecio* (Hegarty et al. 2006), *Brassica* (Albertin et al. 2006), *Triticum* (He et al. 2003), and *Gossypium* neo-polyploids (Flagel et al. 2008)), suggesting that the differential regulation of gene expression is a common feature of plant allopolyploids.

Parent biased gene repression in the allotetraploids lead to global mandarin transcriptome dominance

We observed that most of the genes with under expression for mandarin were subjected to repression in the allotetraploid. When mandarin was over expressed compared to lemon the distribution of the genes was much more equilibrated but displays however a tendency to under expression for the allotetraploid. It should also be noted that transgressive over expression was only observed in the situation where mandarin was over expressed compared with lemon. Anyway considering all the genes with significant differences between the 2

parental genotypes and the allotetraploid we found a strong global dominance of the mandarin transcriptome.

Such transcriptome dominance has been demonstrated in *Arabidopsis* allotetraploid between *A. arenosa* and *A. thaliana*. Indeed Wang et al. (Wang et al. 2006) observed that the genes more highly expressed in *A. thaliana* autotetraploids than in *A. arenosa* are subject to orchestrated repression in the synthetic allotetraploids. Indeed, considering the mid value of the two allotetraploid line analysed, 97% of the gene over expressed in *A. thaliana* were repressed while such under expression was only observed for 47 % of the genes over expressed in *A. arenosa*. Transcriptome dominance was also observed in two recent works in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and demonstrates that the transcriptome dominance should be toward one or the other parent in function of the analyzed organs. The upland cotton was formed by ancient interspecific hybridization between AA and DD genome species. In a large microarray study of ovular tissue Yang et al. (2006) demonstrated that AA subgenome genes of all functional classifications were selectively enriched in *G. hirsutum* L. while in a recent study of petal tissues Flagel et al. (2008) encountered the opposite generalized bias and concluded that neither *Gossypium* genome is globally dominant with respect to expression, but that instead, each genome may have local dominance in certain tissue types or developmental stages. Therefore, transcriptome dominance is likely a general consequence of hybridization effects on gene expression in interspecific hybrids and allopolyploids and appears to be potentially oriented differently in different organs as a probable result of subfunctionalisation of duplicated genes (Lynch and Force 2000).

Interspecific differential gene regulation and non additivity in WLM + EUR allotetraploid are poorly related to functional categories or cellular component localization of gene products

One of the important benefits of microarray studies is that they allow the simultaneously analyze of thousands gene expression. Thus, inferences can be made about the types and categories of genes whose expression is affected by allopolyploidy. We found that, for the genes over expressed for mandarin compared with lemon, no particular functional category of genes was overly affected between lemon and mandarin. Regarding the reciprocal situation significant enrichment was found for the categories "secondary metabolic process", "photosynthesis" and "photosystem I and II"; however they only represent 25 of the 160 genes

of this group. No specific enrichment of cellular component was found for the genes with differential expression meaning that most of the cellular components are concerned. A microarray study of *Senecio* allopolyploid and hybrid species found that expression of no particular functional category of genes was overly affected, although genes involved in floral or pollen development were slightly overrepresented (Hegarty et al. 2006). Similarly, a microarray study of the homoploid hybrid species *H. deserticola* showed differential regulation of genes in various functional categories in the hybrid (Lai et al. 2006). A microarray study of *Arabidopsis* neopolyploids also showed differential expression of genes in a variety of functional categories (Wang et al. 2006). However, in this last study, genes involved in hormonal regulation, in particular the ethylene biosynthesis pathway and cell defense were highly represented. Overall, it appears that expression of a variety of types and categories of genes, including gene products in all cellular components, is altered in allopolyploids and hybrids, but certain species or organ types may show biases for certain types of genes.

Non additive gene expression may leads to dominance or novel phenotype in allopolyploids

Nonadditive expression in allopolyploids can have consequences on phenotypic characters. The global dominance of mandarin transcriptome in the WLM + EUR allotetraploid hybrid is coherent with the results of Gancel et al (2006) who described a proteome dominance of mandarin cv ‘Willow leaf’ when combined by somatic hybridization with Mexican lime (*C. aurantifolia*) an Kumquat cv ‘Marumi’ (*Fortunella japonica*). Even this study does not imply the same parents combined with the mandarin, it suggests a generalized behavior of dominance from the mandarin both at transcriptome and proteome level. Gancel et al. (2006) made the relation between this proteome dominance and the dominance of the aromatic pattern of mandarin over all the other parental species in somatic hybridization schemes (Gancel et al. 2003). It was also demonstrated in *Brassica* neopolyploids that protein abundance can be altered by allopolyploidy (Albertin et al. 2006). A relatively high number of proteins showed quantitative differences in the polyploids as compared with their parents, but few proteins disappeared or appeared.

In a recent work, Bassène et al. (submitted) described the relations between the neo expression of the genes of the carotenoid pathway and the novel pattern of carotenoid

composition of juice sac of the allotetraploid hybrid WLM + EUR. Indeed under expression of the first step of the pathway and transgressive over expression of the last step producing abscisic acid from violaxanthin leads to very low level of total carotenoid but with all the compounds found in mandarin. An other recent example concern the study of genes involved in regulating flowering time, flowering locus C (*FLC*; negatively regulates flowering) and *FRI* (positively regulates *FLC*). In neopolyploids *Arabidopsis*, it was shown that expression levels of *FLC* derived from the *A. thaliana* parent in the allopolyploid were considerably upregulated, whereas expression levels of *FLC* from the *A. arenosa* parent were downregulated (Wang et al. 2006). As a result, flowering time in the neopolyploids was later than in either parent. However, the nucleolar dominance of *A. arenosa* over *A. thaliana* (Chen et al. 1998; Pikaard 1999) is associated with the overall suppression of *A. thaliana* phenotype in new allotetraploids and in natural *A. suecica* (Wang et al. 2006). Results regarding *H. deserticola* suggest that non additive gene regulation and particularly transgressive expression of transport-related proteins should be related with its high adaptability to water-stress conditions (Lai et al. 2006).

Our results for the WLM + EUR allotetraploid show that the under gene expression of mandarin compared with its other parent is highly dominant while when mandarin gene are over expressed the allotetraploid can display, additivity, lemon or mandarin dominance as well as transgressive (over) gene expression. It should be hypothesized that when phenotypic differentiation between mandarin and lemon is associated with underexpression of the mandarin genes, the phenotype of mandarin will be generally dominant while in the opposite situation (overexpression of mandarin), codominance, phenotypic mandarin or lemon dominance as well as overdominance should be observed. Interestingly the group of gene with under expression of mandarin and generalized dominance of mandarin transcriptome display significant enrichment for the functional category "secondary metabolite process".

What should be the underlying mechanisms of differential and non additive gene expression?

Our data suggest a global dominance of the mandarin transcriptome. It should be related with the observations in *Arabidopsis*. Indeed Wang et al. (2006) described that 94% of the repressed genes in the allotetraploids between *A. arenosa* and *A. thaliana* match the genes that were over expressed in *A. thaliana*. They related this result with the silencing of *A. thaliana*

rRNA genes subjected to nucleolar dominance and with overall suppression of the *A. thaliana* phenotype in the synthetic allotetraploids and natural *A. suecica* a putative old natural hybrid between *A. arenosa* and *A. thaliana*. Nucleolar dominance has not been yet described in Citrus interspecific hybrids but this hypothesis might be considered regarding the converging observation of mandarin dominance at transcriptome, proteome and phenotypical level in several interspecific combinations. However several others hypotheses have been proposed to explain why are some genes silenced, downregulated, or upregulated in polyploids. Activation of transposable elements (Madlung et al. 2005; Kashkush et al. 2002; Comai 2000; Madlung et al. 2002; Liu and Wendel 2003) and epigenetic changes such as DNA methylation modification (Salmon et al. 2005; Liu and Wendel 2003; Lukens et al. 2006; Riddle and Birchler 2003) appears as key features in the modulation of allotetraploid gene expression. RNA interference, action of siRNAs and miRNAs and their implication in gene regulation are also good candidates to explain non-additive gene expression (Chen and Chen 2008). In addition to these epigenetic change induced by the 'genomic shock' proposed by McClintock (1984), allopolyploidy induces the juxtaposition and interaction of divergent homeologous regulatory networks leading to new *cis*- and *trans*-acting effects on gene expression (Chen 2007; Landry et al. 2007) and thus non additivity. The predominance of mandarin genome in the WLM + EUR allotetraploid, due to its phylogenic origin (figure 1), is probably associated with allelic balance of regulation factors favorable to mandarin that should contribute to the mandarin transcriptome dominance.

Acknowledgments

We thank the *Collectivité Territoriale de Corse* for granting this study.

References

- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 4649-4654.
- Adams KL, Percifield R, Wendel JF. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 168: 2217-2226.

- Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H. 2006. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* 173: 1101-1113.
- Ancillo G, Gadea J, Forment J, Guerri J, Navarro L. 2007. Class Prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J. Exp. Bot.* 58: 1927-1933.
- Bassene JB, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y. Submitted. Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid *J. Agric. Food Chem*, manuscript submitted.
- Bassene JB, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P. Submitted. Novel pattern of carotenoid contents in the pulp of a Citrus allotetraploid somatic hybrid is associated with non additive expression of the genes of the carotenoid biosynthesis pathway. *BMC Plant Biol*, manuscript submitted.
- Bassene JB. 2009. Implications des interactions noyaux cytoplasmes et de l'allopolyplôidisation sur l'expression phénotypique et génomique chez les agrumes, Corte: Université de Corse-Pascal Paoli, 235 p.
- Chen L, Chen J. 2008. Changes of cytosine methylation induced by wide hybridization and allopolyploidy in *Cucumis*. *Genome* 51: 789-799.
- Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS. 1998. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 14891-14896.
- Chen ZJ. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 377-406.
- Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000b. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12: 1551-1567.
- Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 387-399.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid *Nat. Rev. Genet.* 6: 836-846.
- Conesa A, Gotz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxf.)* 21: 3674-3676.

- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 812-822.
- Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J. 2008. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* 6: 16.
- Gancel AL, Grimplet J, Sauvage FX, Ollitrault P, Brillouet JM. 2006. Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6212-6218.
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM. 2003. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6006-6013.
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM. 2005. Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2224-2230.
- Grant V. 1981. *Plant speciation*. New York: Columbia University Press.
- He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM. 2003. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol. Biol.* 52: 401-414.
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ. 2006. Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Curr. Biol.* 16: 1652-1659.
- Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA. 2005. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Mol. Ecol.* 14: 2493-2510.
- Herrero J, Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, Dopazo J. 2003. GEPAS: a web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3461-3467.
- Herrero R, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1327-1334.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160: 1651-1659.

- Kohonen T. 1990. The self-organizing map. *Proceedings of the IEEE* 78: 1464-1480.
- Lai Z, Gross BL, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH. 2006. Microarray analysis reveals differential gene expression in hybrid sunflower species. *Mol. Ecol.* 15: 1213-1227.
- Landry CR, Hartl DL, Ranz JM. 2007. Genome clashes in hybrids: insights from gene expression. *Heredity* 99: 483-493.
- Lee HS, Chen ZJ. 2001. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6753-6758.
- Liu B, Wendel JF. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 365-379.
- Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L, Osborn T. 2006. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol.* 140: 336-348.
- Lynch M, Force AG. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization *Genetics* 154: 459-473.
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol.* 129: 733-746.
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang HM, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L. 2005. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J.* 41: 221-230.
- Martinez-Godoy MA, Mauri N, Juarez J, Marques MC, Santiago J, Forment J, Gadea J. 2008. A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* 9: (03 July 2008).
- McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SI, Continella G, Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, d'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M. 2000. Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. *Cah. Agric.* 9: 223-236.
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y. 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breed. Rev.* 30: 323-352.
- Ollitrault P, Guo W, Grosser JW. 2007. Somatic hybridization. In Khan IA, editor. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. Oxfordshire: Cabi Publishing; p. 235-260.

- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19: 141-147.
- Pikaard CS. 1999. Nucleolar dominance and silencing of transcription. *Trends Plant Sci.* 4: 1360-1385.
- Pontes O, Neves N, Silva M, Lewis MS, Madlung A, Comai L, Viegas W, Pikaard CS. 2004. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis suecica* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 18240-18245.
- Riddle NC, Birchler JA. 2003. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends Genet.* 19: 597-600.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol. Ecol.* 14: 1163-1175.
- Soltis DE, Soltis PS. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12: 243-273.
- Swanson-Wagner RA, Jia Y, Decook R, Borsuk LA, Nettleton D, Schnable PS. 2006. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 6805-6810.
- Terol J, Conesa A, Colmenero JM, Cercos M, Tadeo F, Agusti J, Alos E, Andres F, Soler G, Brumos J, Iglesias DJ, Gotz S, Legaz F, Argout X, Courtois B, Ollitrault P, Dossat C, Wincker P, Morillon R, Talon M. 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics* 8: (25 January 2007).
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 5116-5121.
- Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ. 2004. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167: 1961-1973.
- Wang JL, Tian L, Lee HS, Chen ZJ. 2006. Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in *Arabidopsis* allopolyploids. *Genetics* 173: 965-974.
- Wang JL, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang HM, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ. 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* 172: 507-517.
- Wendel J, Doyle J. 2005. Polyploidy and evolution in plants. In Henry RJ, editor. *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*. Wallingford: Cabi Publishing; p. 97-117.

Yang SS, Cheung F, Lee JJ, Ha MS, Wei NE, Sze SH, Stelly DM, Thaxton P, Triplett B, Town CD, Chen ZJ. 2006. Accumulation of genome-specific transcripts, transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton. *Plant J.* 47: 761-775.

Figure 1. Phylogenetic origin of the somatic allotetraploid hybrid (WLM + EUR).

Figure 2. Comparison of global genes expression level between parents and the allotetraploid. Data are means of expression log data from each species normalized to the median of the expression in Willow Leaf Mandarin samples. (A) Genes from group 1, (B) Genes from group 2. WLM: Willow leaf mandarin, WLM + EUR: allotetraploid hybrid, EUR: Eureka lemon.

Figure 3. Allotetraploid hybrid gene expression distribution between the two parents and a midparent value. Expression data were normalised to attribute a null value of gene expression for the parent with low expression and 1 to the parent with high expression. A theoretical midparent was assigned at 0.5. (A) Genes from group 1 without 34 transgressive genes, (B) Genes from group 2, (C) 34 transgressive genes. L: lemon, M: mandarin, MP: midparent, LD: lemon dominance, MD: mandarin dominance, H: hybrid means value (A: $H = 0.42 \pm 0.02$; B: $H = 0.09 \pm 0.01$).

Figure 4. Cluster analysis (UPGMA) based in Euclidian distances elaborated from the relative expression of genes displaying significant differentiation among the 3 genotypes (Willow leaf mandarin, WLM + EUR: allotetraploid hybrid, Eureka lemon).

Figure 5. Classification of genes from group 1 among GO functional categories. (A) GO Biological Process categories. (B) GO Cellular Component categories.

Figure 6. Classification of genes from group 2 among GO functional categories. (A) GO Biological Process categories. (B) GO Cellular Component categories.

Figure 7. Classification of the 34 transgressive genes among GO functional categories. (A) GO Biological Process categories. (B) GO Cellular Component categories.

Table 1: Significantly enriched genes from group 2 compared to the reference

GO Term	Name	FDR	Single test p-Value	In test group	In reference group
GO:0019748	secondary metabolic process	0.0246484	1.49932E-4	10	326
GO:0015979	photosynthesis	0.0246484	1.16191E-4	7	146
GO:0009522	photosystem I	0.0246484	7.78436E-5	4	28
GO:0009523	photosystem II	0.0332641	1.54592E-4	4	34

FIGURES

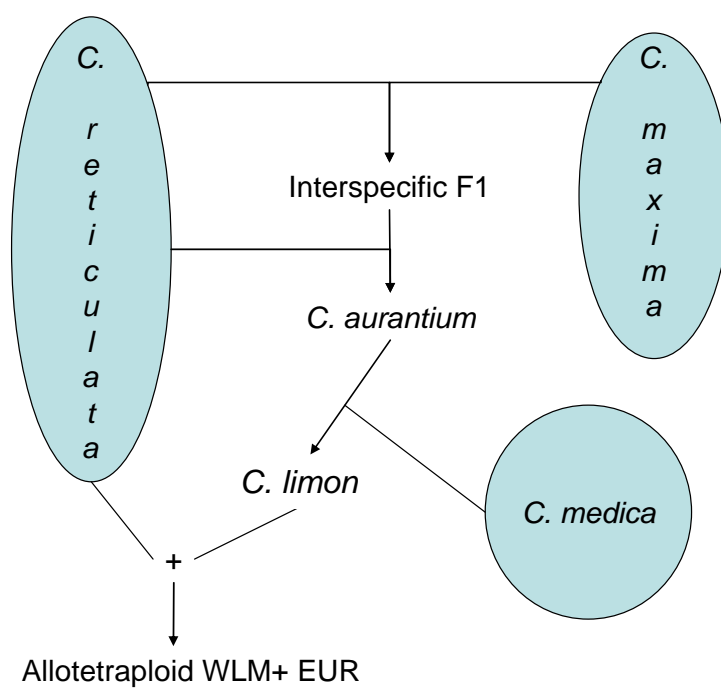


Figure 1

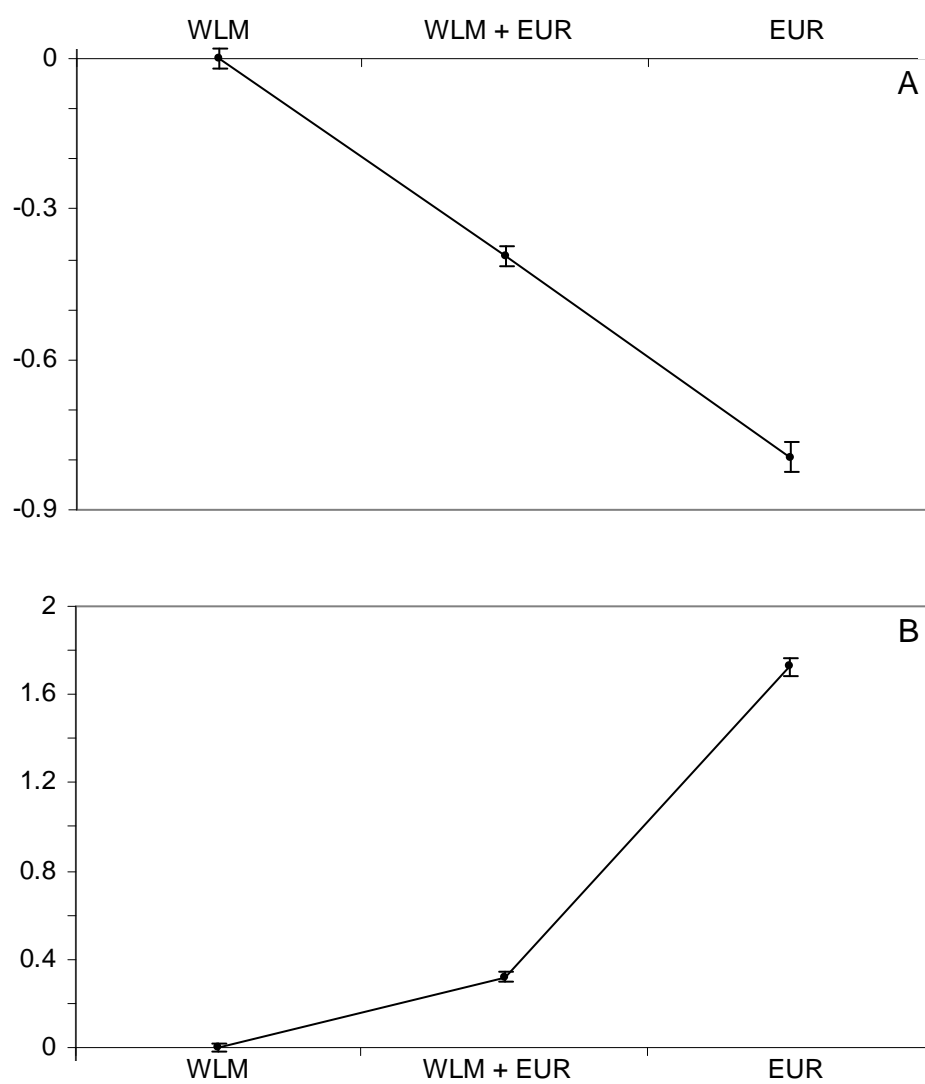


Figure 2

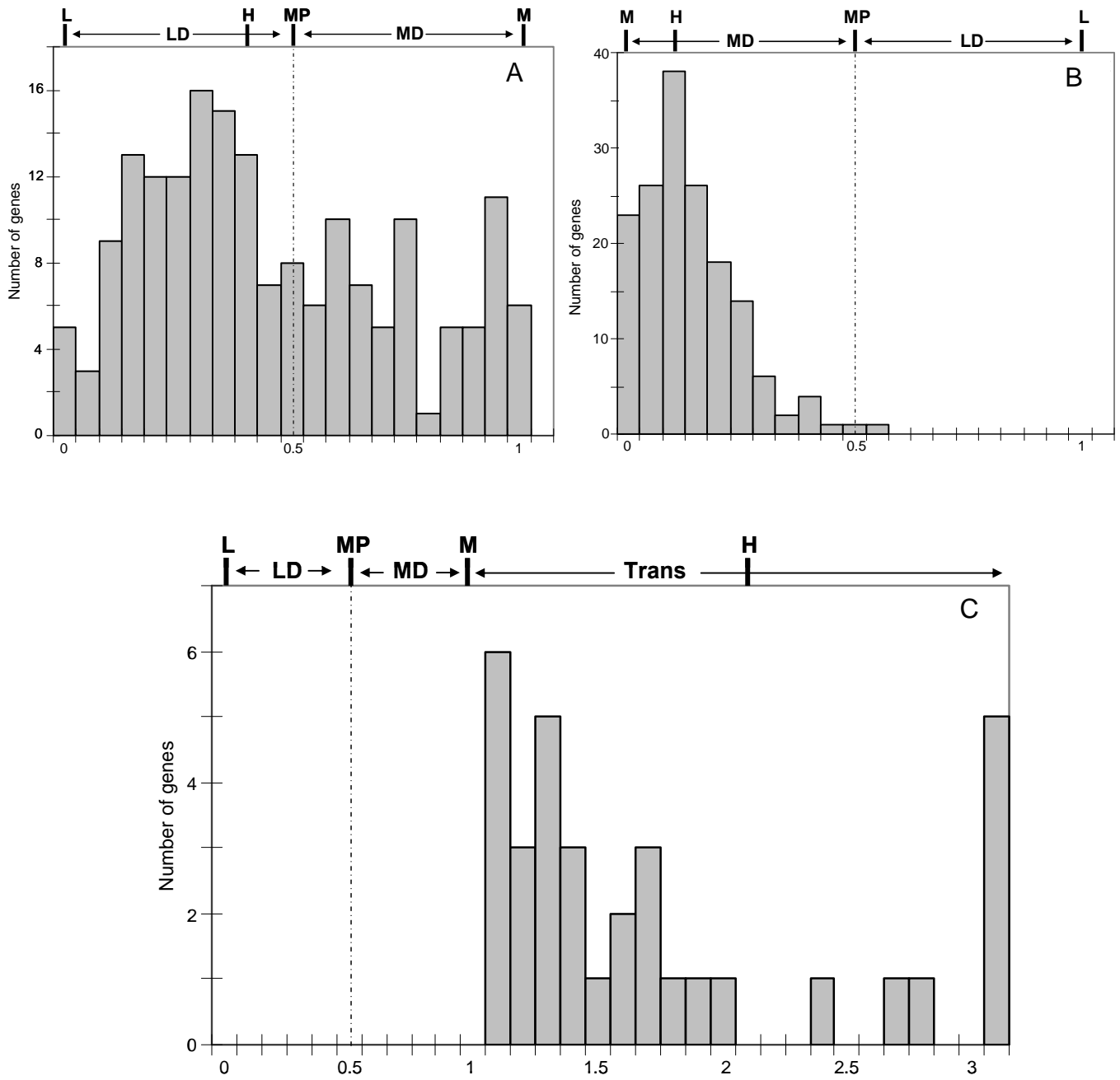


Figure 3

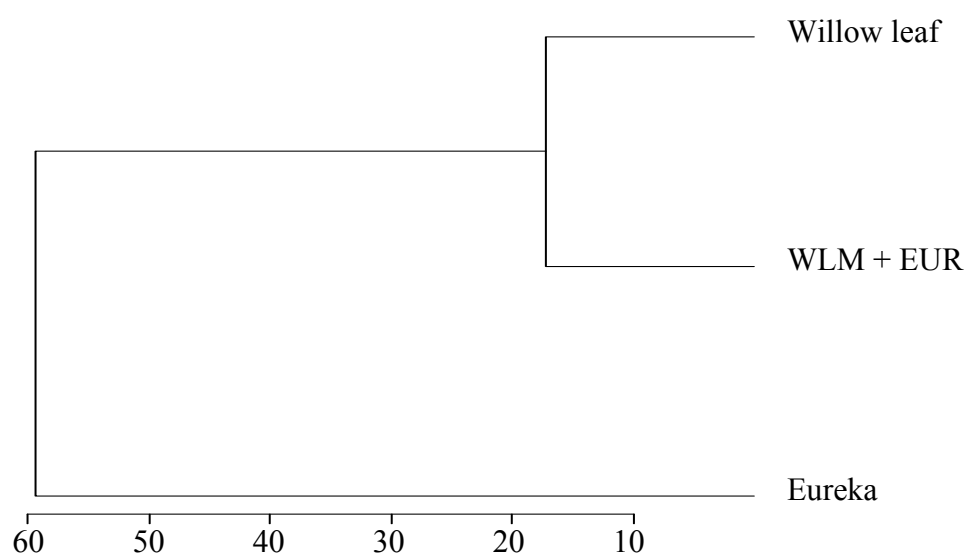


Figure 4

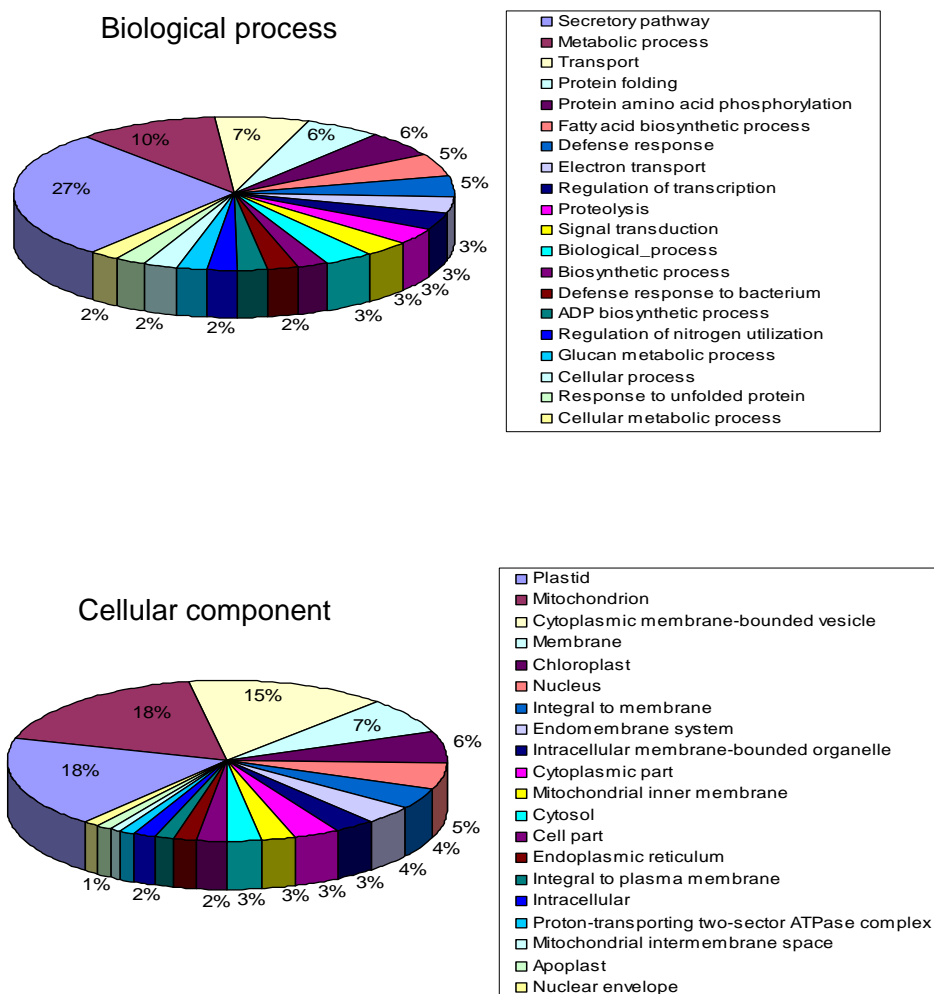


Figure 5

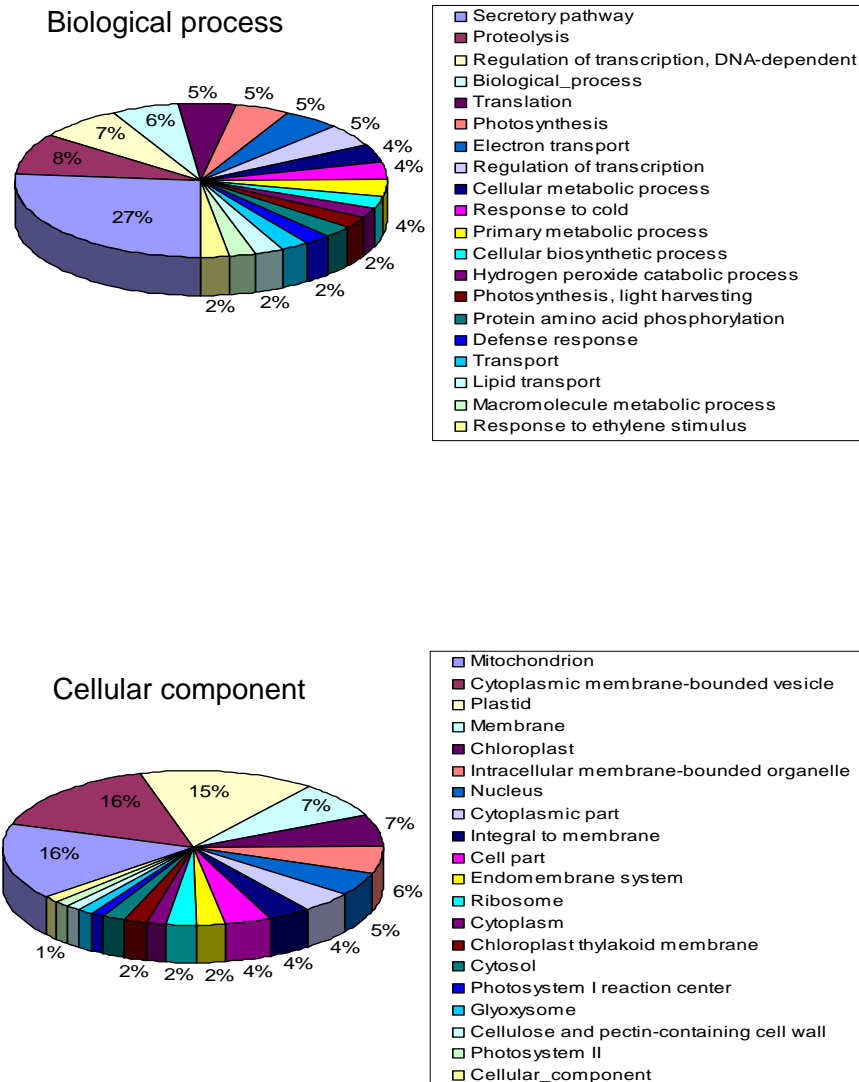
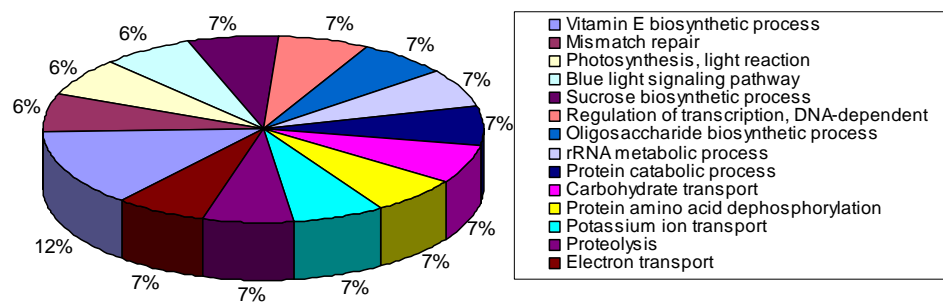


Figure 6

Biological process



Cellular component

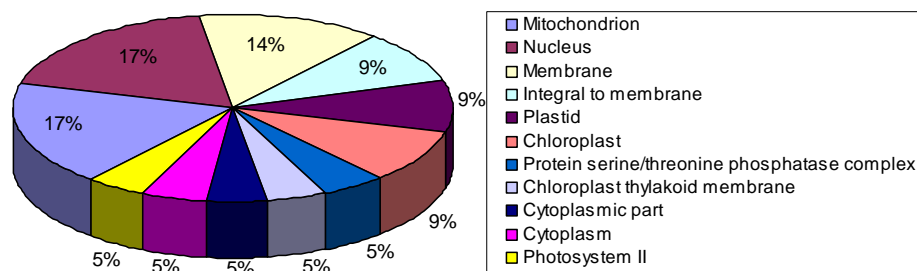


Figure 7

IV. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. DISCUSSION GENERALE

IV.1.1. Impact du génome cytoplasmique sur la régulation du transcriptome et l'élaboration du phénotype

L'obtention d'hybrides somatiques diploïdes (cybrides) associant le noyau d'un parent avec le génome cytoplasmique d'un autre parent, ou alors un génome cytoplasmique issu de la combinaison des organites des deux parents est une approche utilisée pour l'amélioration de certaines espèces végétales (Ollitrault *et al.*, 2007a). Au cours de ce travail, nous avons étudié un cybride de citronnier associant les génomes nucléaire et chloroplastique du citronnier au génome mitochondrial du mandarinier cv 'Willow leaf' (WLM + EUR 2x). L'observation des modifications sur les caractères phénotypiques quantitatifs et qualitatifs et l'observation des modifications d'expression du transcriptome nous ont permis d'étudier l'impact de la substitution de la mitochondrie du citronnier par celle du mandarinier ainsi que les interactions nucléo-mitochondriales.

IV.1.1.1. La mitochondrie dans l'élaboration de la morphologie florale, foliaire et du fruit

La caractérisation morphologique des feuilles, des fruits et des fleurs des variétés parentales et de leur cybride sur des critères choisis à partir des descripteurs de l'IPGRI et de l'UPOV a confirmé la forte différenciation globale du mandarinier et du citronnier, largement décrite lors de diverses études génétiques à partir de données phénotypiques (Barrett et Rhodes, 1976; Scora, 1975). En revanche, le cybride WLM + EUR 2x, arbore des caractères morphologiques similaires au parent citronnier. Seuls quelques caractères tels que l'épaisseur des feuilles, le nombre d'étamines, sont significativement différents des 2 parents. Ce résultat indique que la substitution de la mitochondrie du citronnier par celle du mandarinier n'a pas d'effets drastiques sur les caractères phénotypiques liés aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. Pour d'autres modèles végétaux, les études effectuées sur les cybrides font ressortir des modifications morphologiques très significatives surtout au niveau des organes floraux. Ainsi, *Brassica carinata* avec le cytoplasme de *B. napus* fleurit plus tardivement, présente des filets plus courts, des pistils plus longs, ainsi qu'une réduction de la quantité de pollen et une diminution du nombre de graines (Chang *et al.*, 2007). Pour leur part, les cybrides de *B.*

carinata avec le cytoplasme de *B. juncea* présentent des pistils et des filaments plus courts, une réduction de la longueur et de la largeur des pétales. Ces résultats suggèrent que les organites cytoplasmiques ou les interactions nucléo-cytoplasmiques sont impliqués dans le développement des organes floraux. Les récentes observations de Carlsson *et al.* (2008), sur des lignées CMS de *Brassica napus* avec des mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*, montrent que le développement des fleurs dépend de l'action d'un ensemble de gènes nucléaires, en coordination avec l'action de la mitochondrie. Ainsi, les fleurs des lignées mâles stériles présentent des phénotypes floraux avec des structures de type carpellaire très semblables à celles observées chez les mutants *apetala 3* (*AP3*) et *pistillata* (*PI*) d'*Arabidopsis* et *Antirrhinum*. La conversion des étamines en une structure carpellaire ou pétaloïde a également été observée chez les lignées CMS de *Daucus carotta* (Linke *et al.*, 2003), de *Nicotiana tabacum* (Farbos *et al.*, 2001; Fitter *et al.*, 2005), de *Brassica* (Carlsson *et al.*, 2007; Leino *et al.*, 2003; Malik *et al.*, 1999). La modification du phénotype floral de WLM + EUR 2x, liée à la réduction du nombre d'étamines, est très minime comparée aux observations précédemment citées. Chez *B. carinata*, le cytoplasme de *B. napus* induit beaucoup plus de modifications que celui de *B. juncea*. Chang *et al.* (Chang *et al.*, 2007) proposent que ce soit lié à la plus grande proximité génétique de *B. carinata* avec *B. juncea* qu'avec *B. napus*. De même, différents auteurs ont observés que ce sont des incompatibilités nucléo-cytoplasmiques qui, suite à une alloplasmie ("cybridisation"), à des réarrangements et/ou mutations cytoplasmiques, seraient à l'origine de ces phénotypes particuliers (Allen, 2005; Bogdanova, 2007; Hanson, 1991). Des études moléculaires ont été effectuées sur les fleurs des lignées CMS dans le but de comprendre les mécanismes entrant dans l'élaboration des phénotypes aberrants souvent observés. L'étude de l'expression des gènes *AP3* et *PI* chez des lignées CMS de *Brassica napus* présentant un génome mitochondrial recombiné entre *B. napus* et *A. thaliana*, a révélé une expression plus faible que chez les témoins. Carlsson *et al.* (2007a) ont observé que les gènes *AP3* puis *PI* sont sous exprimés successivement dans les étamines, juste avant leur évolution vers des structures carpellaires. Les résultats suggèrent que l'expression d'*AP3* dans les étamines dépend du bon fonctionnement de la mitochondrie mais également d'une bonne interaction nucléo-mitochondriale (Carlsson *et al.*, 2007). De même chez la carotte (Linke *et al.*, 2003), le blé (Murai *et al.*, 2002), *Brassica* (Teixeira *et al.*, 2005a), le tabac (Zubko *et al.*, 2001) une corrélation entre la répression des gènes nucléaires homéotiques de classe B (*AP3*, *PI*) et le phénotype des CMS a été observée. L'incompatibilité entre le génome nucléaire et les mitochondries étrangères provoque la modification des communications et échanges, responsable de la mort du pollen et de la stérilité mâle

cytoplasmique (CMS) (Fujii et Toriyama, 2008). Ainsi, le phénotype floral de WLM + EUR 2x est sans doute liée à une différenciation génétique modérée entre ses géniteurs, pouvant être liée à la présence au niveau du génome nucléaire du citronnier, de nombreux allèles du pool des mandariniers (Nicolosi *et al.*, 2000). De plus, les études réalisées ont mis en évidence peu de diversité au niveau de l'ADN mitochondrial des agrumes (Froelicher *et al.*, Submitted; Lotfy *et al.*, 2003b; Yamamoto *et al.*, 1993). Le polymorphisme observé au niveau de l'ADN mitochondrial de mandarinier et de citronnier provient de séquences introniques ou intergéniques. Les études sur l'origine mitochondriale du mandarinier et du citronnier montrent qu'elles appartiennent à 2 taxons distincts. Les organites cytoplasmiques du citronnier Euréka ont pour origine le taxon *C. maxima* tandis que le génome mitochondrial du mandarinier 'Willow Leaf' est rattaché au taxon '*C. reticulata*' (Froelicher *et al.*, Submitted; Nicolosi *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 1993). Toutefois, il faut savoir que toutes les espèces cultivées du genre *Citrus* sont issus d'hybridations entre les quatre taxons de bases (cédratiers, mandariniers, pamplemoussiers et mycrantha) (Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2000b), et que la compatibilité sexuelle reste totale entre ces différentes espèces, ce qui témoigne d'une différenciation génétique limitée entre les taxons de base.

IV.1.1.2. Les effets de la mitochondrie dans l'élaboration de la qualité des fruits

Les mesures quantitatives et qualitatives des caractères phénotypiques liés à la qualité de la pulpe des fruits (sucres, acides organiques et caroténoïdes) à maturité chez le cybride WLM + EUR 2x, montrent également de faibles différences entre le cybride et le citronnier. Seule, l'acidité de la pulpe et plus exactement, l'acide citrique présente des taux significativement supérieurs aux 2 parents.

Le métabolisme des sucres et des acides débute par la formation du saccharose produit dans les cellules du mésophylle puis exporté vers le phloème et transporté jusqu'aux organes non photosynthétiques comme les fruits (Taiz et Zeiger, 1998). L'analyse du transcriptome des feuilles de WLM + EUR 2x montre une surexpression de gènes nucléaires impliqués dans le cycle de Calvin (ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase, ribulose-phosphate 3-epimerase, transketolase, fructose-bisphosphate aldolase) producteur des trioses phosphates à partir desquels est synthétisé le saccharose. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un approvisionnement plus important en saccharose des fruits du cybride pourrait être compensé par une glycolyse plus importante, maintenant des teneurs en sucres similaires au citronnier et conduisant aux teneurs plus élevées en acide citrique. En effet, dans le cytoplasme des

cellules des sacs à jus, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose. Ces derniers via la glycolyse donne du pyruvate et du phosphoenolpyruvate servant de précurseur à la synthèse des acides organiques, notamment l'acide citrique, dans les matrices mitochondriales des cellules à jus à travers le cycle de Krebs (Sinclair, 1984; Tucker, 1993). La surproduction d'acide citrique en liaison avec une modification mitochondriale a été observée par Noctor *et al.* (2004) chez un mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* produisant plus de citrate et de malate que les non mutants. Ils en ont conclu que l'état redox de la mitochondrie a son importance dans la synthèse de ces métabolites primaires.

Au final, le remplacement de la mitochondrie du citronnier par celle du mandarinier n'affecte pas les teneurs en sucres dans les fruits. Les trois sucres détectés (saccharose, glucose et fructose) présentent de faibles concentrations comme le citronnier, à l'opposé du mandarinier. Sur d'autres modèles, lors d'études sur le développement du pollen chez des lignées CMS, il a été montré que les interactions nucleo-cytoplasmiques jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des sucres. Ainsi, chez des CMS de *Oryza sativa* (Kong *et al.*, 2007) et de *Zea mays* (Datta *et al.*, 2002) la stérilité a été reliée à la réduction de l'accumulation des carbohydrates en relation avec l'activité de la mitochondrie (Linke et Borner, 2005). Les analyses moléculaires ont permis de montrer que des différences dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres (sucrose synthase, l'invertase acide ...) sont à l'origine de ces faibles teneurs en sucres dans le pollen des CMS comparé aux lignées fertiles (Datta *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2007). Toutefois, il faut noter qu'à la différence des lignées CMS, WLM + EUR 2x ne présente pas de modifications morphologiques très marquées par rapport au citronnier. L'absence d'impact négatif sur les teneurs en sucres chez les fruits du cybride, voir même l'éventuelle surproduction de saccharose au niveau foliaire est donc concordante avec la compatibilité du noyau du citronnier avec la mitochondrie du mandarinier que nous avons proposé sur la base des données morphologiques.

Dans le fruit, la biosynthèse des acides organiques se déroule dans la matrice des mitochondries des cellules à jus (Cercos *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2007). Les teneurs élevées en acides organiques dans les fruits du cybride montrent que la mitochondrie du mandarinier présente bien la capacité fonctionnelle de produire de fortes concentrations en acides. L'hypothèse formulée est que la mitochondrie peut être considérée comme une usine à acides organiques, qui assure la production en fonction de la quantité de substrat glycolytique mise à

sa disposition au niveau du cytosol. Il apparaît donc qu'en amont de la glycolyse, le métabolisme des sucres est similaire voir supérieur à celui du citronnier apportant les quantités de substrat nécessaire à la synthèse de fortes quantités d'acides organiques. Il est probable que, les faibles teneurs en acides de la mandarine sont liées à une réduction du substrat glycolitique (phosphoenolpyruvate et pyruvate servant de substrat à la pyruvate déshydrogénase pour la production d'acétyl-CoA) disponible pour la synthèse d'acides au profit d'une accumulation des sucres.

L'étude sur les caroténoïdes montre que la mitochondrie de mandarinier n'a pas d'influence sur leur métabolisme chez un cybride de citronnier. En effet, la faible composition qualitative et quantitative des caroténoïdes de la pulpe de WLM + EUR 2x est identique à celle du citronnier. Pourtant Fanciullino *et al.* (2006), Matsumoto *et al.* (2007) et Kato *et al.* (2004, 2006) ont montré des différences importantes qualitative et quantitative dans la composition de caroténoïdes entre les citronniers et les mandariniers. Les mandarines sont classées comme des variétés riches en violaxanthine et β -cryptoxanthine ou alors en violaxanthine, phytoène et β -cryptoxanthine, tandis que les citrons sont classés comme des variétés pauvres en caroténoïdes. Nous montrons que l'interaction nucléo-mitochondriale n'a pas altéré le profil phénotypique de citronnier chez le cybride. Le phénotype du cybride est en accord avec sa constitution cellulaire. En effet, les caroténoïdes sont synthétisés dans les plastes (chloroplastes ou chromoplastes) et les enzymes de la voie de biosynthèse sont nucléaires (Gallagher *et al.*, 2004; Taylor et Ramsay, 2005). Ainsi, les mutants de type "ghost" chez la tomate (Barr *et al.*, 2004; Shahbazi *et al.*, 2007) et "immutants" chez *Arabidopsis* (Aluru et Rodermel, 2004; Carol *et al.*, 1999), présentant une altération du métabolisme chloroplastique, se caractérisent par des teneurs de caroténoïdes différents des individus témoins. De même, Atienza *et al.* (2008) ont observé une variation significative de la teneur en lutéine chez des alloplasmes de blé avec différents cytoplasmes. Ces résultats montrent l'importance du cytoplasme dans la biosynthèse des caroténoïdes, et plus particulièrement l'importance des plastes. Il serait particulièrement intéressant d'étudier par la suite des cybrides de citronnier possédant des chloroplastes de mandarinier et d'une manière plus générale les différents cybrides disponibles à la SRA associant le noyau d'une espèce aux chloroplastes d'une autre.

IV.1.1.3. Mitochondrie et régulation du génome nucléaire

Au delà des gènes impliqués dans le cycle de Calvin, l'étude par microarray du transcriptome des feuilles du cybride comparé à celui du citronnier Eureka a mis en évidence une modification de l'expression de 2,5 % des gènes principalement nucléaires. Sachant que le cybride ne diffère du citronnier que par sa mitochondrie de mandarinier, exclusion faite de toute modification somaclonale pouvant advenir au cours de la phase de culture *in vitro*, ces modifications transcriptionnelles peuvent être reliées à l'interaction nucléo-mitochondriale. La substitution de la mitochondrie de citronnier par une mitochondrie de mandarinier a entraîné une expression différentielle de gènes de catégories fonctionnelles très variées. Malgré cela les différences phénotypiques observées au niveau foliaire reste minimales entre le cybride et le citronnier. Dans notre étude seule l'épaisseur de la feuille était significativement plus importante chez le cybride tandis que Fanciullino *et al.* (2005) avaient observé une synthèse plus importante de monoterpène alcools et d'esters également chez le cybride. Nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence de régulation post-transcriptionnelle limitant la différenciation phénotypique entre WLM + EUR 2x et le citronnier. Toutefois, nous n'avons pas effectué une analyse comparée des métabolites des feuilles. En effet, l'analyse microarray révèle que plusieurs gènes intervenant dans les voies métaboliques des sucres, des acides organiques ainsi que dans la photosynthèse sont modulés. Ainsi, bien qu'il n'y ait pas de différence morphologique, il pourrait y avoir une différence au niveau de l'accumulation des métabolites dans les feuilles. Il serait donc judicieux de pouvoir effectuer ces mesures dans une prochaine étude.

Différents travaux se sont intéressés à l'origine de ces interactions nucléo-cytoplasmiques. Les protéines mitochondriales sont généralement complexes et souvent composés de structures chimériques d'origine mixte, nucléaire et mitochondriale. La coordination de l'expression des gènes entre les noyaux et les organites est indispensable pour le bon développement des plantes (Zubko *et al.*, 2001). Des études moléculaires ont démontré l'existence de signaux émis par les organites afin d'induire l'expression de certains gènes nucléaires. Ce processus est connu sous le nom de "retrograde signaling" et permet aux organelles de coordonner leur fonctionnement avec le noyau (Butow et Avadhani, 2004; Liu et Butow, 2006; Rhoads et Subbaiah, 2007; Sekito *et al.*, 2002).

Les études récentes à l'aide des microarrays ont également montré une modification des profils d'expression d'une large gamme de gènes nucléaires. Par exemple, Carlsson *et al.* (2007a) ont observé que les gènes nucléaires codant pour des protéines impliquées dans l'import de protéines dans les organites, des gènes intervenant dans l'"énergie" et le

"métabolisme des protéines", ainsi que des gènes impliqués dans l'architecture cellulaire, sont modulés chez les CMS comparé à *B. napus*. Chez *B. oleracea*, Kang *et al.* (2008) ont observé chez les CMS une variation de l'expression de kinases, de gènes entrant dans l'élaboration des parois cellulaires et des gènes impliqués dans le transport des ions. Le mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* (CMSII) affiche également une modification de l'expression de gènes nucléaires, notamment une surexpression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif : de gènes oxydase alternative (AOX), ascorbate peroxydase et superoxyde dismutase; l'induction de l'expression de catalases à la lumière; et aussi une forte activité NAD(P)H déhydrogénase, suggérant une augmentation de l'expression des gènes codant pour cette enzyme (Dutilleul *et al.*, 2003). Ces résultats montrent que le génome mitochondrial influe fortement sur l'expression des gènes nucléaires et révèle l'importance du processus de "retrograde signaling" entre la mitochondrie et le noyau.

IV.1.2. Expression du génome et élaboration du phénotype chez les allopolyploïdes d'agrumes

L'hybridation somatique a permis d'accroître la diversité au sein des agrumes, en particulier du pool de génotypes tétraploïdes, tout en offrant la possibilité de s'affranchir des incompatibilités rencontrées lors d'hybridations sexuées. A ce jour, peu d'informations sont disponibles sur l'hérédité des caractères dans le cadre de l'hybridation somatique. Sur la base d'une combinaison associant des parents aux phénotypes très contrastés, le mandarinier cv 'Willow Leaf' et le citronnier 'Eureka', nous avons analysés l'hérédité de nombreux caractères phénotypiques en parallèle d'une étude globale du transcriptome. Un lien direct a pu être fait entre la constitution en caroténoïdes dans la pulpe et l'expression des gènes de la chaîne de biosynthèse de ces métabolites secondaires.

IV.1.2.1. Effets de l'allopolyploïdisation sur le phénotype: contribution inégale des parents à l'élaboration des caractères phénotypiques

Il est avéré, que la combinaison de deux génomes distincts provoque de vastes modifications structurelles et fonctionnelles dont les mécanismes sont encore mal compris (Albertin *et al.*, 2007). Ces modifications sont à l'origine d'hérédités non additives chez les plantes allopolyploïdes, et peuvent conduire à l'apparition de phénotypes nouveaux, absents chez les diploïdes parentaux et sortant des gammes de variabilité des espèces originelles (Chen et Ni, 2006; Comai *et al.*, 2000; Madlung *et al.*, 2002; Osborn *et al.*, 2003).

Notre étude a porté sur la transmission d'un grand nombre de caractères phénotypiques (morphologiques et biochimiques) chez un hybride entre le mandarinier et le citronnier. L'hybride allotétraploïde WLM + EUR 4x présente des caractères phénotypiques nouveaux, différents de ceux des parents, mais qui ne sortent pas de la gamme de variabilité liée aux contributions parentales. En effet, les caractères phénotypiques de l'hybride allotétraploïde bien qu'originaux (exemple: fruits très acides avec taux de sucres relativement élevé), sont soit intermédiaires aux parents, soit très proches de l'un ou l'autre des parents. Ainsi, au niveau morphologique, le phénotype des feuilles et des fleurs de l'hybride WLM + EUR 4x est très proche du citronnier tandis que le phénotype des fruits est plus proche du mandarinier. De même, nos résultats biochimiques montrent une dominance du phénotype citronnier pour les teneurs en acides organiques, une codominance pour les teneurs en glucose et saccharose, et une dominance mandarinier pour le fructose et la composition aromatique du zeste. Enfin, la constitution en caroténoïdes du mandarinier est dominante au plan qualitatif, alors que les faibles teneurs en caroténoïdes du citronnier sont dominantes au plan quantitatif. La

variabilité observée dans l'élaboration des caractères phénotypiques montre qu'il est difficile de s'appuyer sur une hypothèse d'additivité pour traiter des relations phénotypiques entre parents diploïdes et hybrides allopolyploïdes.

De même, les travaux menés sur l'hérédité des composés aromatiques de feuilles (Alonzo *et al.*, 2000; Fatta del Bosco *et al.*, 1998; Gancel *et al.*, 2002; Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005a; Gancel *et al.*, 2005b; Gancel *et al.*, 2006) et des polyphénols de la pulpe (Tusa *et al.*, 2007) dans le cadre de l'hybridation somatique chez les agrumes témoignent de la difficulté de prévoir le profil des hybrides en fonction de celui de leurs parents. Les auteurs en concluent que l'hybridation somatique n'entraîne pas à une simple addition des différents caractères parentaux (Gancel *et al.*, 2003; Gancel *et al.*, 2005b; Tusa *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus sur différentes espèces suggèrent que la variance d'interactions serait à l'origine d'une part importante de la variabilité phénotypique souvent observée chez les allopolyploïdes. Ainsi, chez les agrumes l'étude des composés aromatiques des feuilles d'un dispositif diallèle d'hybrides somatiques a mis en évidence l'importance de cette variance d'interactions (Gancel, 2004). Les profils qualitatifs et quantitatifs des composés aromatiques des hybrides entre le mandarinier commun (*C. deliciosa*) et le limetier mexicain [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.], le citronnier Eureka [*C. limon* (L.) Burm.], l'oranger Shamouti [*C. sinensis* (L.) Osb.], le pomelo Star Ruby (*C. paradisi* Macfayden), le kumquat Nagami [*Fortunella margarita* (Lour.) Swing.], le poncirus [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] sont marqués par la dominance du mandarinier sur les autres parents. En revanche, chez les hybrides somatiques résultants des combinaisons entre le limetier, le citronnier, le cédratier, l'oranger et le pomelo, aucune dominance n'a été clairement observée contrairement aux hybridations impliquant le mandarinier (Gancel *et al.*, 2005a). De tel phénomène de dominance ont également été observé plus largement chez les hybrides allotétraploïdes entre *Arabidopsis thaliana* et *A. arenosa*. Ceux-ci, malgré une morphologie souvent variable, sont caractérisés par leur grande ressemblance morphologique avec le parent *A. arenosa* (Comai *et al.*, 2000; Madlung *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Les auteurs parlent d'une dominance morphologique d'*A. arenosa* sur *A. thaliana*.

Pour l'hybride allotétraploïde WLM+EUR 4x, nos observations, effectuées sur une large gamme de caractères, mettent plutôt en évidence une tendance globale de non additivité qu'une dominance complète d'un parent comme précédemment observée pour certaines combinaisons spécifiques sur les arômes des feuilles pour les agrumes ou de la morphologie chez *Arabidopsis*. Nous avons en effet observé qu'en fonction des caractères, c'est le phénotype de l'un ou de l'autre parent qui est dominant. La synthèse de ces résultats suggère

un reformatage significatif de la régulation des génomes parentaux chez l'hybride allotétraploïde. Cette hypothèse a été testée par l'analyse du transcriptome.

IV.1.2.2. Une expression non additive du transcriptome concordante avec l'absence de codominance pour l'hérédité de nombreux caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes

L'hybridation somatique est un procédé biotechnologique qui aboutit à la somme de 2 génomes nucléaires parentaux. Tout comme l'allopolyploïdisation naturelle, processus récurrent au cours de l'évolution des plantes, l'hybridation somatique contribue à la duplication des gènes dans les génomes de plantes. La polyploïdie conduit souvent à des changements dans le génome et dans l'organisation de l'expression génique (Adams, 2007; Wendel, 2000). Les études moléculaires permettent d'avoir une idée sur les mécanismes potentiels à l'origine de la large gamme phénotypique observée chez les polyploïdes. La grande majorité des modifications moléculaires observées chez les allopolyploïdes se sont avérées non additives, ce qui montre que le transcriptome des hybrides n'est pas simplement un mélange des transcriptomes des parents (Hegarty et Hiscock, 2008). Chez l'hybride somatique WLM + EUR 4x, l'analyse du transcriptome de la pulpe par microarrays, montre, pour les gènes présentant une variabilité significative entre les 3 génotypes, une expression globale non additive des gènes marquée par une dominance du transcriptome du mandarinier sur celui du citronnier. Lorsque les gènes modulés sont réprimés chez le mandarinier comparé au citronnier, ils présentent une expression très inférieure à la valeur du parent moyen et donc proche du mandarinier. De plus, lorsque les gènes modulés sont surexprimés chez le mandarinier comparé au citronnier, ils présentent une expression mieux répartie de part et d'autre de la valeur du parent moyen. Nous observons donc un effet plus marqué du mandarinier sur le transcriptome de l'allotétraploïde. Ces données transcriptomiques peuvent être rapprochées des résultats observés pour les protéomes de deux hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes combinant le mandarinier cv 'Willow leaf' à la lime mexicaine et le mandarinier cv 'Willow leaf' au kumquat cv 'Marumi'. Pour ces deux hybrides l'expression du mandarinier était en effet globalement dominante pour les spots protéiques communs aux parents et à l'hybride (Gancel *et al.*, 2006). Ces auteurs faisaient la relation entre cette dominance globale du protéome du mandarinier et la dominance des profils aromatiques foliaires du mandarinier chez les hybrides somatiques (Gancel *et al.*, 2003). Nos résultats nous conduisent à étendre cette relation au transcriptome et aux composés aromatiques du zeste de l'hybride WLM + EUR 4x (Bassene *et al.*, Submitted).

De même, les analyses moléculaires sur les allotétraploïdes entre *Arabidopsis thaliana* et *A. arenosa*, qui présente une grande ressemblance morphologique avec ce dernier, montrent que ce phénotype est lié à une expression non additive des gènes (Wang *et al.*, 2006). La majorité des gènes avec une expression non additive sont réprimés comparés à la valeur d'expression du parent moyen. Sachant qu'une grande proportion de ces gènes est surexprimée chez *A. thaliana* comparé à *A. arenosa*, les auteurs ont conclu que la dominance morphologique est liée à une répression coordonnée du transcriptome d'*A. thaliana*. Ainsi, la dominance du phénotype aromatique du mandarinier pourrait être liée à la dominance transcriptomique.

L'étude de l'expression par PCR en temps réel des gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes dans la pulpe des fruits fait également ressortir l'existence d'une nouvelle forme de régulation chez l'allotétraploïde. En effet, la majorité des gènes montre bien un profil d'expression non additif concordant avec l'analyse global du transcriptome par microarray. Toutefois on note une dominance de la faible expression du citronnier sur le profil d'expression des gènes présents en amont de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (*CitDxs*, *CitZds* et *CitLcy-b*), et une dominance du mandarinier sur l'étape clé de formation des β,β -xanthophylles (*CitHy-b*). De plus, *CitNced* responsable du catabolisme des caroténoïdes en faveur d'une production d'ABA montre une surexpression transgressive. Ces profils d'expression sont bien corrélés aux résultats phénotypiques observés chez l'hybride allotétraploïde correspondant à des fruits contenant l'ensemble des caroténoïdes trouvés chez le mandarinier mais à de faibles concentrations. La combinaison des génomes du citronnier et du mandarinier a permis de nouvelles interactions alléliques à l'origine de ce phénotype particulier.

Il serait intéressant de pouvoir étudier les mécanismes de régulation de l'expression chez l'hybride allotétraploïde pour comprendre comment se traduit la dominance ou la répression alternée des gènes homéologues. Chez les allotétraploïdes d'*Arabidopsis*, il a été montré que la répression spécifique du transcriptome d'*A. thaliana* est la conséquence d'un phénomène épigénétique de dominance nucléolaire marquée par le "silencing" des gènes ARN ribosomiaux (ARNr) du génome d'*A. thaliana* (Chen *et al.*, 1998; Lee et Chen, 2001). Ce phénomène se traduit en grande partie par l'absence d'expression des copies de gènes d'*A. thaliana* dans les hybrides en raison de l'inactivité de sa machinerie traductionnelle. Des reformatages de la méthylation du génome, de l'acétylation des histones, l'activation d'éléments transposables, ainsi que l'action des siRNAs et miRNAs ((Chen, 2007) pour revue

bibliographique) ont également été décrits comme autant de mécanismes conduisant au "silencing" de certains gènes.

Chez les hybrides allotétraploïdes de mandarinier, Gancel *et al.* (2006) ont mis à jour la présence de phénomènes de "silencing" pouvant expliquer la dominance du mandarinier pour la composition aromatique au niveau des feuilles. L'altération de l'expression des gènes chez deux hybrides somatiques interspécifique (*C. deliciosa* + *C. aurantifolia*) et intergénérique (*C. deliciosa* + *Fortunella japonica*) par rapport à leurs parents apparaît globalement très forte lors de l'étude du protéome. Ils ont observé aussi bien des "silencing", affectant plus particulièrement les parents *C. aurantifolia* et *F. japonica* (environ 75% des spots spécifiques de ces parents sont éteints chez les hybrides), que l'apparition de nombreux nouveaux spots (14% pour l'hybride avec *C. aurantifolia* et 29% pour celui avec *F. japonica* ; dont 5 sont communs aux deux hybrides) (Gancel *et al.*, 2006). Nos observations, soulèvent la possibilité de l'existence des mêmes phénomènes de régulations par "silencing", mais alternés entre les transcriptomes des deux parents conduisant à la dominance du phénotype de l'un ou l'autre parent en fonction du caractère et des organes observés. Cet aspect mérite d'être vérifié par des études moléculaires plus spécifiques permettant d'analyser l'expression des allèles homéologues (cDNA-SSCP (Adams *et al.*, 2003; Cronn et Adams, 2003), microarrays allèles spécifiques (Stupar *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007)) et d'explorer d'éventuelles origines épigénétiques de la neorégulation du transcriptome comme un reformatage de la méthylation du génome (MSAP, (Chen et Chen, 2008; Shaked *et al.*, 2001)).

IV.2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact des interactions entre le génome nucléaire et le génome cytoplasmique sur l'élaboration du phénotype des hybrides somatiques diploïdes (cybrides), et analysé l'hérédité des caractères dans le cadre de l'allotétraploïdisation en relation avec un éventuel reformatage de l'expression génomique.

Un cybride et un hybride somatique allotétraploïde issus d'une combinaison mandarinier + citronnier ont été choisis pour cette étude car les parents présentent des phénotypes très contrastés. Le matériel expérimental (hybrides somatiques et parents) a été caractérisé à l'aide de marqueurs moléculaires nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux. Ainsi, l'hybride WLM + EUR 2x, est un cybride diploïde possédant le noyau et les chloroplastes du citronnier associés à la mitochondrie du mandarinier. Ce cybride nous a permis d'aborder l'étude des interactions nucléo-cytoplasmiques. L'hybride WLM + EUR 4x, est un allotétraploïde possédant les noyaux du mandarinier et du citronnier en association avec le cytoplasme du mandarinier. Cet hybride nous a permis d'aborder l'étude des implications de l'allopolypléidie dans l'expression phénotypique des agrumes.

IV.2.1. Effet de l'interaction génome nucléaire-génome mitochondrial sur l'élaboration du phénotype et l'expression génomique

IV.2.1.1. Influence de l'origine de la mitochondrie sur le phénotype

La description phénotypique basée sur les caractères morphologiques des feuilles, des fleurs et des fruits du cybride comparés aux deux variétés parentales, nous a permis de montrer que l'interaction entre le génome nucléaire du citronnier et le génome mitochondrial du mandarinier n'affecte que très peu les caractères morphologiques du cybride. Les rares modifications observées sont très discrètes et concernent le nombre d'étamines et l'épaisseur du limbe des feuilles. Ces faibles modifications morphologiques contrastent avec les observations faites sur d'autres modèles végétaux et pourraient être liées à une compatibilité des génomes nucléaire et mitochondrial du citronnier et du mandarinier respectivement. Concernant la qualité de la pulpe du fruit, l'étude de la variation des concentrations des 7 principaux acides organiques de la pulpe du fruit (acide citrique, malique, ascorbique, succinique, quinique, oxalique, tartarique) nous a permis de montrer que seule la teneur en acide citrique varie significativement. En revanche, la composition en sucres (glucose,

saccharose et fructose) n'est pas affectée par l'interaction du noyau du citronnier et de la mitochondrie du mandarinier. De même, nous n'avons observé aucune différence significative pour les teneurs des deux seuls caroténoïdes (β -cryptoxanthine et β -carotène) observés aussi bien chez le cybride que chez le citronnier.

Notre étude n'a pas traité de l'interaction noyau-chloroplaste qui s'avère jouer, chez d'autres modèles végétaux, un rôle essentiel dans le métabolisme des caroténoïdes. Il faudrait pouvoir compléter cette étude avec une analyse de cybrides chloroplastiques afin d'analyser les effets liés à l'interaction nucléo-chloroplastique, particulièrement sur les teneurs et les compositions en caroténoïdes.

IV.2.1.2. Effet de la mitochondrie sur l'expression des gènes d'origine nucléaire

L'étude du transcriptome des feuilles du cybride et du citronnier par microarrays a mis en évidence des modifications de l'expression de gènes principalement nucléaires. Nous avons ainsi mis en évidence l'altération des profils d'expression de gènes nucléaires entrant dans une large gamme de processus métaboliques. On note principalement, la modification de l'expression des gènes impliqués dans la voie métabolique des carbohydrates (glycolyse et gluconéogenèse), de la biosynthèse des acides organiques (voie du citrate), de la voie de la NAD/NADH phosphorylation et déphosphorylation, de la voie du methylerythritol phosphate (MEP), et de la voie respiratoire avec des oxydases alternatives. Les gènes impliqués dans la photosynthèse sont particulièrement affectés, ce qui témoigne d'une forte interaction des organites. Le cybride, n'étant différencié du citronnier que par sa mitochondrie, ces variations peuvent donc être reliées à une interaction nucléo-mitochondriale.

Afin de poursuivre l'étude sur l'importance du rôle de l'interaction mitochondrie noyau sur le phénotype et l'expression génomique, il serait intéressant de créer et d'étudier d'autres cybrides entre espèces plus éloignées au sein de la famille des *Aurantioideae* pour déterminer le seuil de la compatibilité des génomes.

Les résultats d'analyses du transcriptome par microarrays sont le témoin des mécanismes de régulation transcriptionnelle ne tenant pas compte des régulations post transcriptionnelles. Il serait donc intéressant de pouvoir lancer en complément de cette analyse du transcriptome, des analyses protéomiques et métabolomiques ainsi que des dosages d'activités enzymatiques pour mettre en évidence les phénomènes de régulation post-

transcriptionnelle et mieux cibler certains gènes clés des voies métaboliques. Cette approche pourrait être intéressante pour la compréhension des mécanismes limitant la différenciation phénotypique entre WLM + EUR 2x et le citronnier, mais également des fortes teneurs en acide de la pulpe des fruits du cybride.

Les observations sur les teneurs en acides du cybride font de lui un modèle potentiel pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'accumulation des acides chez les variétés acides d'agrumes. Il serait également intéressant de créer un cybride avec le noyau et les chloroplastes du mandarinier associé avec la mitochondrie du citronnier pour analyser les effets sur un fruit doux, mais également pour une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme des acides chez les agrumes.

IV.2.2. Les perspectives pour l'amélioration des agrumes

Les faibles modifications phénotypiques constatées sur le cybride montrent l'intérêt que peut revêtir la "cybridisation" en amélioration des agrumes. Ainsi, des caractères comme la stérilité mâle cytoplasmique, présente chez les mandariniers Satsuma, pourraient être transmis à des variétés présentant des qualités organoleptiques intéressantes, mais riche en pépins, sans affecter la qualité des fruits. La "cybridisation" pourrait être également utilisée pour transférer des caractères de résistances aussi bien au niveau des porte-greffes qu'au niveau variétal. En effet, des mécanismes spécifiques de tolérance au mal secco ont déjà été observés chez des cybrides de citronnier. De même, la sensibilité racinaire du porte-greffe rough-lemon a pu être associée à une mutation du génome mitochondrial ; il serait intéressant de corriger ce défaut du 'Rough Lemon' en combinant le noyau de ce porte-greffe au génome mitochondrial de génotypes résistants. Par ailleurs, Froelicher *et al.* (soumis) ont mis en évidence, à l'aide des marqueurs PCR mitochondriaux, l'existence chez les agrumes d'un groupe de porte-greffes ayant en commun l'origine de leur cytoplasme. Il serait intéressant de créer de nouveaux cybrides avec ce cytoplasme spécifique afin d'analyser si les caractéristiques agronomiques qui ont fait sélectionner ces génotypes comme porte-greffes sont liées aux organites cytoplasmiques ou à des composantes nucléaires héritées d'un ancêtre commun porteur de ce même cytoplasme.

IV.2.3. Effet de l'allopolyploïdisation sur l'élaboration du phénotype et l'expression génétique

IV.2.3.1. Elaboration du phénotype chez un allotétraploïde

La description pomologique des feuilles, des fleurs et des fruits de l'hybride allotétraploïde comparé aux parents nous a permis d'observer une grande variabilité dans l'hérédité des caractères phénotypiques liée à l'interaction entre les génomes du mandarinier et du citronnier. La majorité des caractères phénotypiques observés présentent une dominance de l'un ou l'autre des parents tandis que certains montrent une codominance. Le phénotype des feuilles et des fleurs de l'hybride WLM + EUR 4x est très proche du citronnier tandis que le phénotype des fruits est plus proche du mandarinier. De même, l'analyse des métabolites primaires et secondaires nous a permis d'observer une dominance du phénotype citronnier pour les teneurs en acides organiques dans la pulpe des fruits de l'hybride allotétraploïde. Par contre, nous montrons la présence d'une codominance pour les teneurs en glucose et saccharose, avec toutefois une dominance du mandarinier pour les teneurs en fructose et la composition aromatique du zeste. En revanche, la composition des caroténoïdes est dominée au niveau qualitatif par le mandarinier et au niveau quantitatif par le citronnier. Ainsi, on ne peut pas s'appuyer juste sur une hypothèse d'additivité pour traiter des relations phénotypiques entre parents diploïdes et hybrides allopolyploïdes.

IV.2.3.2. Expression du transcriptome chez un allotétraploïde

Nous avons étudié par PCR quantitative l'expression des différents gènes impliqués dans l'élaboration de la composition en caroténoïdes de la pulpe des fruits de WLM + EUR 4x. Le profil d'expression des gènes *CitDxs*, *CitZds* et *CitLcy-b* est dominé par la sous-expression du citronnier, les gènes *CitPsy*, *CitPds* et *CitZep* montrent une expression égale à celle du parent moyen et *CitHy-b* est dominé par la sur-expression du mandarinier. De plus, *CitNced* impliqué dans le catabolisme des caroténoïdes présente une surexpression chez l'hybride allotétraploïde. Nous avons pu ainsi montrer que la composition particulière des caroténoïdes de l'hybride allotétraploïde est en relation avec la régulation non additive de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

La voie de biosynthèse des caroténoïdes et de l'ABA est un bon modèle dont les gènes sont bien caractérisés. Il serait intéressant de poursuivre notre étude dans les feuilles où les caroténoïdes contribuent à la protection des fonctions photosynthétiques et les racines où la

synthèse d'ABA est un élément central de la réponse aux stress salin/hydrique. Il serait particulièrement intéressant de s'intéresser à une éventuelle subfonctionnalisation de l'expression des différentes formes alléliques provenant du citronnier ou du mandarinier. Ce travail couplé à une étude sur le stress hydrique pourrait apporter des réponses sur les mécanismes de tolérances accrues aux stress hydrique et salin, observé chez les tétraploïdes d'agrumes.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'élaboration du phénotype de l'hybride allotétraploïde a pu être complétée par une analyse globale du transcriptome de la pulpe par microarray (cDNA de 20K). Les données d'expression de l'hybride allotétraploïde comparé aux parents nous ont permis de mettre en évidence une fréquence relativement élevée d'expression génomique non additive chez WLM + EUR 4x, en concordance avec les différentes observations de dominances observées aux niveaux morphologiques et biochimiques. Une dominance globale du transcriptome de mandarinier a par ailleurs été observée, liée à la répression quasi systématique de l'expression chez l'hybride somatique des gènes sous exprimés chez le mandarinier en comparaison du citronnier. Cette dominance touche toutes les fonctions et localisation du produit des gènes. Par la suite, il serait intéressant d'étudier le transcriptome des différents organes de l'allotétraploïde afin de voir si la régulation non additive et l'orientation de la dominance en fonction des gènes y est la même.

Nous n'avons pas étudié les mécanismes à l'origine de la régulation non additive des gènes homéologues de l'hybride allotétraploïde. Cet aspect mérite d'être traité pour une meilleure compréhension de l'élaboration du phénotype des allotétraploïdes d'agrumes. Nous proposons donc de l'aborder par des études moléculaires plus spécifiques permettant d'analyser l'expression des allèles homéologues tels que la cDNA-SSCP et les microarrays allèles spécifiques mais également de pouvoir explorer d'éventuelles origines épigénétiques de la neorégulation du transcriptome comme un reformatage de la méthylation du génome en examinant le polymorphisme d'amplification sensible à la méthylation (MSAP). D'autres études pourraient compléter ces travaux pour tester l'hypothèse d'une éventuelle dominance nucléolaire comme celle qui a été mise en évidence chez les hybrides interspécifiques d'*Arabidopsis*.

Par ailleurs, il serait également intéressant d'étendre cette étude à une gamme élargie d'hybrides somatiques. Enfin, afin d'analyser l'importance relative de l'hybridation interspécifique et de la polyploïdisation dans le reformatage de l'expression du génome et l'élaboration du phénotype des allotétraploïdes d'agrumes, il serait intéressant d'étudier les hybrides diploïdes obtenus à la SRA entre les 3 taxons de base *C. reticulata*, *C. maxima* et *C. medica* ainsi que certains couples diploïdes/autotétraploïdes également disponibles à la SRA.

IV.2.4. Perspectives de l'allotétraploïdisation pour l'amélioration des agrumes

Nos résultats montrent, sur une large gamme de caractères phénotypiques, que l'hybridation somatique ne conduit pas à une expression phénotypique additive. De plus, en fonction des caractères, le phénotype de l'un ou l'autre parent peut être dominant. Il est probable que pour certains caractères, comme cela a été observé pour la résistance au virus de la Tristeza, cette dominance est équivalente à celle observée chez les hybrides sexués diploïdes. Toutefois, pour d'autres caractères, les résultats obtenus au niveau du transcriptome suggèrent qu'un reformatage de l'expression du génome détermine la non additivité du phénotype. Les données bibliographiques sur d'autres modèles végétaux montrent que dans de telles situations, la variance d'interaction est une composante essentielle dans l'élaboration du phénotype. La prédiction du phénotype des allotétraploïdes apparaît dans ces conditions difficile en l'absence d'études systématiques. Nos résultats relativisent donc l'atout de l'hybridation somatique, généralement mis en avant pour l'amélioration des porte-greffes, de permettre l'addition des génomes et donc l'addition des caractères dominants. L'optimisation des schémas de création variétale s'appuyant sur l'allotétraploïdisation par hybridation somatique, requiert aujourd'hui des travaux approfondies aux niveaux phénotypique et moléculaire, afin d'identifier les reformatages orientés de manières constantes par l'un des parents ou par la divergence des espèces parentales et ceux qui sont au contraire aléatoires. Le matériel végétal créé par le CIRAD et en particulier les hybrides somatiques allotétraploïdes créés suivant un plan d'hybridation diallèle entre 5 espèces du genre *Citrus* et ceux issus d'un test cross entre mandarinier cv "Willow leaf" et 7 espèces appartenant aux genres *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* apparaît particulièrement adapté à ce type d'étude. Si la dominance du transcriptome du mandarinier pour les gènes sous exprimés chez le mandarinier s'avéraient systématique, l'étude du transcriptome des espèces parentales pourrait être très utile pour la prédiction du phénotype des hybrides somatiques avec le mandarinier.

V. REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, K. L.; Cronn, R.; Percifield, R.; Wendel, J. F.** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 4649-4654.
- Adams, K. L.; Percifield, R.; Wendel, J. F.** Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* **2004**, 168, 2217-2226.
- Adams, K. L.** Evolution of Duplicate Gene Expression in Polyploid and Hybrid Plants. *J. Hered.* **2007**, 98, 136-141.
- Aharoni, A.; Vorst, O.** DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 48, 99-118.
- Albertin, W.; Alix, K.; Balliau, T.; Brabant, P.; Davanture, M.; Malosse, C.; Valot, B.; Thiellement, H.** Differential regulation of gene products in newly synthesized Brassica napus allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization. *BMC Genomics* **2007**, 8, (21 February 2007).
- Albertini, M. V.; Carcouet, E.; Pailly, O.; Gambotti, C.; Luro, F.; Berti, L.** Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8335-8339.
- Albertini, M. V.** Caractérisation Biochimique et moléculaire des fruits d'agrumes (*Citrus* sp.). Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pascal Paoli, Corte, **2007**, p 148.
- Allen, J. O.** Effect of teosinte cytoplasmic genomes on maize phenotype. *Genetics* **2005**, 169, 863-880.
- Alonzo, G.; Bosco, S. F. D.; Palazzolo, E.; Saiano, F.; Tusa, N.** Citrus somatic hybrid leaf essential oil. *Flavour Frag. J.* **2000**, 15, 258-262.
- Aluru, M. R.; Rodermeil, S. R.** Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiol. Plant* **2004**, 120, 4-11.
- Andersson, S. G. E.; Karlberg, O.; Canback, B.; Kurland, C. G.** On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, 358, 165-177.
- Arisumi, T.** Rescuing abortive Impatiens hybrids through aseptic culture of ovules. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1985**, 110, 273-276.

- Atienza, S. G.; Martin, A. C.; Ramirez, M. C.; Martin, A.; Ballesteros, J.** Effects of *Hordeum chilense* cytoplasm on agronomic traits in common wheat. *Plant Breed.* **2007**, 126, 5-8.
- Atienza, S. G.; Martin, A.; Pecchioni, N.; Platani, C.; Cattivelli, L.** The nuclear-cytoplasmic interaction controls carotenoid content in wheat. *Euphytica* **2008**, 159, 325-331.
- Aubert, B.; Vullin, G.**, *Citrus nurseries and planting techniques*. **1997**; p 184
- Babiychuk, E.; Schantz, R.; Cherep, N.; Weil, J. H.; Gleba, Y.; Kushnir, S.** Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in Solanaceae cybrids. *Mol. Gen. Genet.* **1995**, 249, 648-654.
- Baldwin, E. A.**, Citrus fruit. In *Biochemistry of fruit ripening*, Seymour, Ed. Chapman and Hall: London, **1993**; pp 107-149.
- Banga, S. S.; Labana, K. S.; Medhi, B. N.** Alternaria incidence in some alloplasmic lines of Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss.). *Theor. Appl. Genet.* **1984**, 67, 195-196.
- Barr, J.; White, W. S.; Chen, L.; Bae, H.; Rodermeil, S.** The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* **2004**, 27, 840-852.
- Barrett, H. C.; Rhodes, A. M.** A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst. Bot.* **1976**, 1, 105-136.
- Barrett, H. C.; Hutchinson, D. J.** Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of citrus *Journal of Economic Botany* **1978**, 32, 27-45.
- Barrett, H. C.** An autotetraploid of the Key lime, *Citrus aurantifolia*. *Fruit Varieties Journal* **1992**, 46, 166-170.
- Barsby, T. L.; Chuong, P. V.; Yarrow, S. A.; Wu, S. C.; Coumans, M.; Kemble, R. J.; Powell, A. D.; Beversdorf, W. D.; Pauls, K. P.** The combination of Polima CMS and cytoplasmic triazine resistance in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **1987**, 73, 809-814.
- Bassene, J. B.; Berti, L.; Costantino, G.; Carcouet, E.; Kamiri, M.; Tomi, F.; Dambier, D.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.** Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid *J. Agric. Food Chem.* **Submitted**.
- Beck, S. L.; Dunlop, R. W.; Fossey, A.** Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Bot. J. Linn. Soc.* **2003**, 141, 177-181.
- Beidler, J. L.; Hilliard, P. R.; Rill, R. L.** Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* **1982**, 126, 374-380.
- Belliard, G.; Vedel, F.; Pelletier, G.** Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* **1979**, 281, 401-403.

- Bergman, P.; Edqvist, J.; Farbos, I.; Glimelius, K.** Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol. Biol.* **2000**, 42, 531-544.
- Berversdorf, W. D.; Weiss-Lerman, J.; Erickson, L. R.; Souza Machado, V.** Transfer of cytoplasmically-inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B. napus*). *Can. J. Genet. Cytol.* **1980**, 22, 167-172.
- Blanc, G.; Hokamp, K.; Wolfe, K. H.** A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res.* **2003**, 13, 137-144.
- Bogdanova, V. S.** Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* **2007**, 114, 333-339.
- Bonnett, H. T.; Djurberg, I.; Fajardo, M.; Glimelius, K.** A mutation causing variegation and abnormal development in tobacco is associated with an altered mitochondrial DNA. *Plant J.* **1993**, 3, 519-525.
- Bowman, J. L.; Smyth, D. R.; Meyerowitz, E. M.** Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1989**, 1, 37-52.
- Bowman, J. L.; Smyth, D. R.; Meyerowitz, E. M.** Genetic interaction among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development* **1991**, 112, 1-20.
- Butow, R. A.; Avadhani, N. G.** Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* **2004**, 14, 1-15.
- Cabasson, C. M.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Grosser, J. W.** Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **2001**, 20, 604-609.
- Cai, X.; Fu, J.; Deng, X.; Guo, W.** Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **2007**, 90, 275-283.
- Cameron, J. W.; Frost, H. B.** Genetic, Breeding and nucellar embryony. In *The Citrus Industry*, Reuther W, Ed. University of California: Riverside, **1968**; Vol. 1, pp 325-370.
- Cameron, J. W.; Soost, R. K.** Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny *Proceeding 1st international Citrus symposium* **1969**, 1, 199-205.
- Carlsson, J.; Lagercrantz, U.; Sundstrom, J.; Teixeira, R.; Wellmer, F.; Meyerowitz, E. M.; Glimelius, K.** Microarray analysis reveals altered expression of a large number of nuclear genes in developing cytoplasmic male sterile *Brassica napus* flowers. *Plant J.* **2007**, 49, 452-462.

- Carlsson, J.; Leino, M.; Sohlberg, J.; Sundstroem, J. F.; Glimelius, K.** Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* **2008**, 8, 74-86.
- Carol, P.; Stevenson, D.; Bisanz, C.; Breitenbach, J.; Sandmann, G.; Mache, R.; Coupland, G.; Kuntz, M.** Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **1999**, 11, 57-68.
- Cavalier-Smith, T.** Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* **1978**, 34, 247-278.
- Cercos, M.; Soler, G.; Iglesias, D. J.; Gadea, J.; Forment, J.; Talon, M.** Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Mol. Biol.* **2006**, 62, 513-527.
- Chang, C. T.; Uesugi, R.; Hondo, K.; Kakihara, F.; Kato, M.** The effect of the cytoplasms of *Brassica napus* and *B. juncea* on some characteristics of *B. carinata*, including flower morphology. *Euphytica* **2007**, 158, 261-270.
- Chase, C. D.** Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet.* **2007**, 23, 81-90.
- Chen, L.; Chen, J.** Changes of cytosine methylation induced by wide hybridization and allopolyploidy in *Cucumis*. *Genome* **2008**, 51, 789-799.
- Chen, Z. J.; Pikaard, C. S.** Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 3442-3447.
- Chen, Z. J.; Comai, L.; Pikaard, C. S.** Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 14891-14896.
- Chen, Z. J.; Ni, Z. F.** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* **2006**, 28, 240-252.
- Chen, Z. J.** Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, 58, 377-406.
- Cheng, Y.; Vicente, M. C. D.; Meng, H.; Guo, W.; Tao, N.; Deng, X.** A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol.* **2005**, 25, 661-672.
- Cheng, Y. J.; Guo, W. W.; Deng, X. X.** Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*)+Meiwa

- kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Rep.* **2002**, 21, 445-451.
- Collonnier, C.; Fock, I.; Daunay, M. C.; Servaes, A.; Vedel, F.; Siljak-Yakovlev, S.; Vongthip, S.; Darasinh, S.** Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbirifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Science* **2003**, 164, 849-861.
- Comai, L.** Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol. Biol.* **2000**, 43, 387-399.
- Comai, L.; Tyagi, A. P.; Winter, K.; Holmes-Davis, R.; Reynolds, S. H.; Stevens, Y.; Byers, B.** Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* **2000**, 12, 1551-1567.
- Conesa, A.; Gotz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M.** Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxf.)* **2005**, 21, 3674-3676.
- Cronn, R.; Adams, K. L.** Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *BioTechniques* **2003**, 34, 726-734.
- Cunningham, F. X., Jr.; Gantt, E.** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 557-583.
- D'hont, A.; Grivet, L.; Feldmann, P.; Rao, P.; Berding, N.; Glaszmann, J. C.** Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular & General Genetics* **1996**, 250, 405-413.
- Datta, R.; Chamusco, K. C.; Chourey, P. S.** Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiol.* **2002**, 130, 1645-1656.
- Demming-Adams, B.; Gilmore, A. M.; Adams, W. W.** In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **1996**, 10, 403-412.
- Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M. J.** Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2140-2145.
- Dietrich, W.; Wagner, W.; Raven, E. H.** Systematics of *Oenothera* section *Oenothera* subsection *Oenothera* (*Onagraceae*). *Syst. Bot. Monogr.* **1997**, 50, 1-234.
- Doyle J J, D. J. L.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **1987**, 19, 11-15.

- Dutilleul, C.; Garmier, M.; Noctor, G.; Mathieu, C.; Chetrit, P.; Foyer, C. H.; Paepe, R. D.** Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* **2003**, 15, 1212-1226.
- Erickson, L. C.**, The general physiology of citrus. In *The Citrus Industry*, University of California ed.; Reuther, W.; Batchlor, L. D.; Webber, H. J.: Riverside, California, **1968**; Vol. II, pp 86-126.
- Esen, A.; Soost, R. K.** Unexpected triploid in *Citrus*: Their origin, identification and possible use. *J. Hered.* **1971**, 62, 329-333.
- Fanciullino, A. L.; Gancel, A. L.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Brillouet, J. M.** Effects of nucleo-cytoplasmic interactions on leaf volatile compounds from citrus somatic diploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4517-4523.
- Fanciullino, A. L.; Dhuique-Mayer, C.; Luro, F.; Casanova, J.; Morillon, R.; Ollitrault, P.** Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4397-4406.
- Farbos, I.; Mouras, A.; Bereterbide, A.; Glimelius, K.** Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. *Plant J.* **2001**, 26, 131-142.
- Fatta Del Bosco, S.; Palazzolo, E.; Scarano, M. T.; Germana, M. A.; Tusa, N.** Comparison between essential oil yield and constituents of an allotetraploid somatic hybrid of Citrus and its parents. *Adv. Hort. Sci.* **1998**, 12, 72-77.
- Feldman, M.; Liu, B.; Segal, G.; Abbo, S.; Levy, A. A.; Vega, J. M.** Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* **1997**, 147, 1381-1387.
- Fitter, J. T.; Thomas, M. R.; Niu, C.; Rose, R. J.** Investigation of *Nicotiana tabacum* (+) *N. suaveolens* cybrids with carpelloid stamens. *J. Plant Physiol.* **2005**, 162, 225-235.
- Fock, I.; Collonnier, C.; Lavergne, D.; Vaniet, S.; Ambroise, A.; Luisetti, J.; Kodja, H.; Sihachakr, D.** Evaluation of somatic hybrids of potato with *Solanum stenotomum* after a long-term in vitro conservation. *Plant Physiology and Biochemistry* **2007**, 45, 209-215.
- Fraser, P. D.; Bramley, P. M.** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **2004**, 43, 228-265.
- Froelicher, Y.; Luro, F.; Ollitrault, P.** Analysis of meiotic behavior of the tetraploid species *Clausena excavata* by molecular marker segregation studies. *international Society of Citrus Congress* **2000**, 140.

- Froelicher, Y.; Bassene, J.-B.; Jedidi-Neji, E.; Dambier, D.; Morillon, R.; Bernardini, G.; Costantino, G.; Ollitrault, P.** Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* **2007**, 26, 937-944.
- Froelicher, Y.; Dambier, D.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Lotfy, S.; Didout, C.; Beaumont, V.; Brottier, P.; Risterucci, A. M.; Luro, F.; Ollitrault, P.** Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Notes* **2008**, 8, 119-122.
- Froelicher, Y.; Mouhaya, W.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Hussain, S.; Kamiri, M.; Curk, F.; Morillon, R.; Ollitrault, P.** New universal mitochondrial PCR markers reveal maternal citrus phylogeny and give new information on mandarin and lime origin. **Submitted.**
- Frost, H. B.; Soost, R. K.** Seed reproduction: development of gametes and embryos. In *The Citrus Industry*, University of California ed.; W. Reuther, LD., Batchelor & H. J. Webber: Riverside, California, **1968**; Vol II, pp 290-324.
- Fujii, S.; Toriyama, K.** Genome Barriers between Nuclei and Mitochondria Exemplified by Cytoplasmic Male Sterility. *Plant Cell Physiol.* **2008**, 49, 1484 - 1494.
- Gaeta, R. T.; Pires, J. C.; Iniguez-Luy, F.; Leon, E.; Osborn, T. C.** Genomic Changes in Resynthesized Brassica napus and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *Plant Cell* **2007**, 19, 3403-3417.
- Gallagher, C. E.; Matthews, P. D.; Li, F. Q.; Wurtzel, E. T.** Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol.* **2004**, 135, 1776-1783.
- Galun, E.; Aviv, D.; Breiman, A.; Fromm, H.; Perl, A.; Vardi, A.,** Cybrids in Nicotiana, Solanum and Citrus: isolation and characterization of plastome mutants: pre-fusion treatments, selection and analysis of cybrids. In *Plant molecular biology. Proceedings of a NATO Advanced Study Institute, 10-19 June, 1987, Carlsberg Lab., Copenhagen, Denmark., 1987*; pp 199-207.
- Gancel, A. L.; Olle, D.; Ollitrault, P.; Luro, F.; Brillouet, J. M.** Leaf and peel volatile compounds of an interspecific citrus somatic hybrid [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.+ *Citrus paradisi* Macfayden]. *Flavour Frag. J.* **2002**, 17, 416-424.
- Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M.** Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing

willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6006-6013.

Gancel, A. L. Etude de l'hérédité des composés d'arôme chez des hybrides somatiques d'agrumes. Thèse de Doctorat Université de Corse-Pascal Paoli, Corte, **2004**, p 408.

Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, 53, 2224-2230.

Gancel, A. L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J. M. Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour Frag. J.* **2005b**, 20, 626-632.

Gancel, A. L.; Grimplet, J.; Sauvage, F. X.; Ollitrault, P.; Brillouet, J. M. Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6212-6218.

Gandia, M.; Conesa, A.; Ancillo, G.; Gadea, J.; Forment, J.; Pallas, V.; Flores, R.; Duran-Vila, N.; Moreno, P.; Guerri, J. Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by Citrus tristeza virus. *Virology* **2007**, 367, 298-306.

Gardner, P. T.; White, T. A. C.; Mcphail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **2000**, 68, 471-474.

Gaut, B. S. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res.* **2001**, 11, 55-66.

Germana, M. A., Androgenesis in Citrus : A Review. In *Proceedings of 7th International Citrus Congress. International Society of Citriculture*, Acireale, Italy, **1992**; Vol. 1, pp 183-189.

Glimelius, K.; Bonnett, H. T. Nicotiana cybrids with Petunia chloroplasts. *Theor. Appl. Genet.* **1986**, 72, 794-798.

Gross, J., *Pigments in Fruits*. Harcourt Brace Javanocih: London, U.K., **1987**; p 303.

Grosser, J. W.; Gmitter, F. G., Jr. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed. Rev.* **1990**, 8, 339-374.

Grosser, J. W.; Gmitter, F. G., Jr.; Louzada, E. S.; Chandler, J. L. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. *Hortscience* **1992**, 27, 1125-1127.

- Grosser, J. W.; Gmitter, F. G., Jr.; Tusa, N.; Recupero, G. R.; Cucinotta, P.** Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Rep.* **1996a**, 15, 672-676.
- Grosser, J. W.; Mourao-Fo, F. A. A.; Gmitter, F. G., Jr.; Louzada, E. S.; Jiang, J.; Baergen, K.; Quiros, A.; Cabasson, C.; Schell, J. L.; Chandler, J. L.** Allotetraploid hybrids between Citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **1996b**, 92, 577-582.
- Grosser, J. W.; Ollitrault, P.; Olivares-Fuster, O.** Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **2000**, 36, 434-449.
- Grosser, J. W.; Medina-Urrutia, V.; Ananthakrishnan, G.; Serrano, P.** Building a replacement sour orange rootstock: somatic hybridization of selected mandarin + pummelo combinations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2004**, 129, 530-534.
- Grosser, J. W.; Chandler, J. L.; Duncan, L. W.** Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Hort.* **2007**, 113, 33-36.
- Guo, W. W.; Deng, X. X.** Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Rep.* **1998**, 18, 297-300.
- Guo, W. W.; Deng, X. X.; Yi, H. L.** Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* **2000**, 116, 281-285.
- Guo, W. W.; Prasad, D.; Cheng, Y. J.; Serrano, P.; Deng, X. X.; Grosser, J. W.** Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep.* **2004**, 22, 752-758.
- Guo, W. W.; Grosser, J. W.** Transfer of a potential canker resistance gene into Citrus protoplasts using GFP as the selectable marker. *Acta Horticulturae* **2004**, 255-258.
- Hanson, M. R.** Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 461-486.
- Hanson, M. R.; Bentolila, S.** Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* **2004**, 16, S154-S169.
- Hegarty, M. J.; Hiscock, S. J.** Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr. Biol.* **2008**, 18, R435-R444.
- Hidaka, T.; Omura, M.** Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and rough lemon (*C. jambhiri*) or yuzu (*C. junos*). *Japanese Journal of Breeding* **1992**, 42, 79-89.

- Hirschberg, J.** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, 4, 210-218.
- Hu, Q.; Andersen, S. B.; Dixelius, C.; Hansen, L. N.** Production of fertile intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* for the enrichment of the rapeseed gene pool. *Plant Cell Rep.* **2002**, 21, 147-152.
- Iwamasa, M.** Studies on the sterility in the genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bul. Hort. Res. Sta. Japan* **1966**, 6, 1-77.
- Iwamasa, M.; Nito, N.** Cytogenetic and the evolution of modern cultivated Citrus. *Proceeding of 6st international Citrus congress* **1988**, 265-275.
- Iwamoto, Y.; Hirai, M.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Ezura, H.** Fertile somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitswongsei* (syn. *S. kurzii*) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant. *Plant Biotechnology* **2007**, 24, 179-184.
- Jackson, L. K.; Sherman, W. B.** Chromosome counts in "Tahiti" lime. *Proceeding of Florida State Horticulture Society* **1975**, 88, 458-459.
- Jacquemond, C.; Blondel, L.** Contribution to the study of citrus rootstocks: *Poncirus trifoliata*. Part III. Study of the performance of *Poncirus trifoliata* cultivars after grafting. *Fruits* **1986**, 41, 449-464.
- Kang, J.; Zhang, G.; Bonnema, G.; Fang, Z.; Wang, X.** Global analysis of gene expression in flower buds of Ms-cd1 *Brassica oleracea* conferring male sterility by using an *Arabidopsis* microarray. *Plant Mol. Biol.* **2008**, 66, 177-192.
- Karadeniz, F.** Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turk. J. Agric. For.* **2004**, 28, 267-271.
- Kashkush, K.; Feldman, M.; Levy, A. A.** Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat. Genet.* **2003**, 33, 102-106.
- Kato, M.; Jodo, S.; Tanaka, T.** Effect of Abyssinian mustard cytoplasm on CC genome of Brassica. *Japanese Journal of Breeding* **1990**, 40, 475-484.
- Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hyodo, H.; Yano, M.** Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* **2004**, 134, 824-837.
- Kato, M.; Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Okuda, H.; Yano, M.** The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 2153-2164.
- Katz, E.; Fon, M.; Lee, Y. J.; Phinney, B. S.; Sadka, A.; Blumwald, E.** The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta* **2007**, 226, 989-1005.

- Kellogg, E. A.** What happens to genes in duplicated genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 4369-4371.
- Khan, I. A.; Grosser, J. W.** Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. *Euphytica* **2004**, 137, 271-278.
- Khan, I. A.; Kender, W. J.**, Citrus breeding: introduction and objectives. In *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, **2007**; pp 1-8.
- Khan, M. M.; Khan, I. A.; Mugal, A. H.**, Growth and morphological comparison of diploid and tetraploid stains of Kinnow mandarin. In *Proceedings of 7th International Citrus Congress. International Society of Citriculture*, Tribulato E., Ed. Acireale, Italy, **1992**; Vol. 1, pp 93-95.
- Kisaka, H.; Kisaka, M.; Kanno, A.; Kameya, T.** Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theor. Appl. Genet.* **1997**, 94, 221-226.
- Kobayashi, S.; Ohgawara, T.; Saito, W.; Nakamura, Y.; Omura, M.** Production of triploid somatic hybrids in Citrus. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **1997**, 66, 453-458.
- Kofer, W.; Glimelius, K.; Bonnett, H. T.** Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco. *Plant Cell* **1991**, 3, 759-769.
- Kong, J.; Li, Z.; Tan, Y. P.; Wan, C. X.; Li, S. Q.; Zhu, Y. G.** Different gene expression patterns of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of rice. *Physiol. Plant* **2007**, 130, 136-147.
- Krug, C. A.** Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae, with special reference in the genus Citrus *Citrus Bot. l Gasette* **1943**, 104, 602-611.
- Kubo, T.; Hohjo, I.; Hiratsuka, S.** Sucrose accumulation and its related enzyme activities in the juice sacs of satsuma mandarin fruit from trees with different crop loads. *Scientia Hort.* **2001**, 91, 215-225.
- Kushnir, S.; Babiychuk, E.; Bannikova, M.; Momot, V.; Komarnitsky, I.; Cherep, N.; Gleba, Y.** Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome. *Mol. Gen. Genet.* **1991**, 225, 225-230.
- Kushnir, S. G.; Shlumukov, L. R.; Pogrebnyak, N. J.; Berger, S.; Gleba, Y.** Functional cybrid plant possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome. *Mol. Gen. Genet.* **1987**, 209, 159-163.
- Lawrence, B. M.** Progress in essential oils. *Perfumer & Flavorist* **1996**, 21, 25-28, 30-32.

- Lee, H. S.; Chen, Z. J.** Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 6753-6758.
- Lee, L. S.; Gillespie, D.; Shaw, R.** Prospects for using citrus tetraploids for rootstocks. *Proc 3rd World Congr Int Soc of Citrus Nurserymen. Australia* **1990**, pp 198-203.
- Leino, M.; Teixeira, R.; Landgren, M.; Glimelius, K.** Brassica napus lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theor. Appl. Genet.* **2003**, 106, 1156-1163.
- Leitch, I. J.; Bennett, M. D.** Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 470-476.
- Leon, P.; Arroyo, A.; Mackenzie, S.** Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 453-480.
- Li, Y. G.; Tanner, G. J.; Delves, A. C.; Larkin, P. J.** Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, lucerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin). *Theor. Appl. Genet.* **1993**, 87, 455-463.
- Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M.** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **1997**, 400, 271-274.
- Ling, J. T.; Iwamasa, M.** Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. *Plant Cell Rep.* **1994**, 13, 493-497.
- Linke, B.; Nothnagel, T.; Borner, T.** Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS. *Plant J.* **2003**, 34, 27-37.
- Linke, B.; Borner, T.** Mitochondrial effects on flower and pollen development. *Mitochondrion* **2005**, 5, 389-402.
- Liu, B.; Brubaker, C. L.; Mergeai, G.; Cronn, R. C.; Wendel, J. F.** Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **2001**, 44, 321-330.
- Liu, J. H.; Xu, X. Y.; Deng, X. X.** Advances on Citrus somatic hybrids and inheritance of their nuclear and cytoplasmic components. *Journal of Agricultural Biotechnology* **2004**, 12, 237-246.
- Liu, Z.; Butow, R. A.** Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* **2006**, 40, 159-185.
- Lois, L. M.; Rodriguez-Concepcion, M.; Gallego, F.; Campos, N.; Boronat, A.** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* **2000**, 22, 503-513.

- Longley, A. E.** Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Journal of the Washington Academy of Science* **1925**, 15, 347-351.
- Lossi, A.; Gotz, M.; Braun, A.; Wenzel, G.** Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica* **2000**, 116, 221-230.
- Lota, M. L.; Rocca Serra, D. D.; Tomi, F.; Casanova, J.** Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, 29, 77-104.
- Lotfy, S.; Luro, F.; Froelicher, Y.; Risterucci, A. M.; Filloux, D.; Ollitrault, P.** Development of microsatellite markers for chloroplastic genome studies in *Citrus*. *7th International congress of plant molecular biology* **2003a**.
- Lotfy, S.; Luro, F.; Carreel, F.; Froelicher, Y.; Rist, D.; Ollitrault, P.** Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2003b**, 128, 225-230.
- Loussert, R.** Techniques agricoles Méditerranéennes, les agrumes. Lavoisier, **1989**, p 158.
- Luro, F.; Rist, D.; Ollitrault, P.** Evaluation of genetic relationships in *Citrus* genus by means of sequence tagged microsatellites. *Acta Horticulturae* **2001**, 237-242.
- Luro, F.; Maddy, F.; Jacquemond, C.; Froelicher, Y.; Morillon, R.; Rist, D.; Ollitrault, P.** Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Acta Horticulturae* **2004**, 841-847.
- Lysak, M. A.; Pecinka, A.; Schubert, I.** Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Res.* **2003**, 11, 195-204.
- Madlung, A.; Masuelli, R. W.; Watson, B.; Reynolds, S. H.; Davison, J.; Comai, L.** Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol.* **2002**, 129, 733-746.
- Madlung, A.; Tyagi, A. P.; Watson, B.; Jiang, H. M.; Kagochi, T.; Doerge, R. W.; Martienssen, R.; Comai, L.** Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J.* **2005**, 41, 221-230.
- Malik, M.; Vyas, P.; Rangaswamy, N. S.; Shivanna, K. R.** Development of two new cytoplasmic male-sterile lines in *Brassica juncea* through wide hybridization. *Plant Breed.* **1999**, 118, 75-78.
- Martin, W.; Herrmann, R. G.** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol.* **1998**, 118, 9-17.

- Martinez-Godoy, M. A.; Mauri, N.; Juarez, J.; Marques, M. C.; Santiago, J.; Forment, J.; Gadea, J.** A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* **2008**, 9, (03 July 2008).
- Masterson, J.** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science (Washington)* **1994**, 264, 421-424.
- Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Kato, M.; Kuniga, T.; Nakajima, N.; Yoshida, T.** Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 2356-2368.
- Matsuo, M.; Obokata, J.** Remote control of photosynthetic genes by the mitochondrial respiratory chain. *Plant J.* **2006**, 47, 873-882.
- Mayne, S. T.** Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* **2003**, 133, 933S-940S.
- Menke, U.; Schilde-Rentschler, L.; Ruoss, B.; Zanke, C.; Hemleben, V.; Ninnemann, H.** Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization. *Theor. Appl. Genet.* **1996**, 92, 617-626.
- Metzlaff, M.; Pohlheim, F.; Börner, T.; Hagemann, R.** Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Curr. Genet.* **1982**, 5, 245-249.
- Miranda, M.; Motomura, T.; Ikeda, F.; Ohgawara, T.; Saito, W.; Endo, T.; Omura, M.; Moriguchi, T.** Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. *Plant Cell Rep.* **1997**, 16, 401-405.
- Moore, G.; Devos, K. M.; Wang, Z.; Gale, M. D.** Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* **1995**, 5, 737-739.
- Moreira, C. D.; Chase, C. D.; Gmitter, F. G., Jr.; Grosser, J. W.** Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. *Mol. Breed.* **2000a**, 6, 401-405.
- Moreira, C. D.; Chase, C. D.; Gmitter, F. G., Jr.; Grosser, J. W.** Transmission of organelle genomes in citrus somatic hybrids. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **2000b**, 61, 165-168.
- Mouhaya, W.** Caractérisation physiologique et moléculaire de la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tétraploïdes d'agrumes. Thèse de Doctorat, Université de Corse-Pascal Paoli, Corte, **2008**, p 202.
- Mouhaya, W.; Allario, T.; Costantino, G.; Bassene, J. B.; Dambier, D.; Hmyene, A.; Marseti, B. E.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Morillon, R.** Salt stress physiological behaviour and genomic expression of autotetraploids and allotetraploid

intergeneric hybrid compared to their diploid *Citrus deliciosa* and *Poncirus trifoliata* parents. *Tree Physiol.* Submitted.

Mourao Filho, F. D. A. A.; Pio, R.; Mendes, B. M. J.; Azevedo, F. A. D.; Schinor, E. H.; Entelmann, F. A.; Alves, A. S. R.; Cantuarias-Aviles, T. E. Evaluation of citrus somatic hybrids for tolerance to *Phytophthora nicotianae* and citrus tristeza virus. *Scientia Hort.* **2008**, 115, 301-308.

Mueller, L. A.; Zhang, P.; Rhee, S. Y. AraCyc: a biochemical pathway database for Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2003**, 132, 453–460.

Murai, K.; Takumi, S.; Koga, H.; Ogihara, Y. Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *Plant J.* **2002**, 29, 169-181.

Navarro, L.; Juarez, J.; Aleza, P.; Pina, J. A., Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2N x 2N and 2N x 4N crosses by embryo rescue and flow cytometry. In *Plant biotechnology 2002 and beyond. Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Orlando, Florida, USA, 23-28 June, 2002*, **2003**; pp 541-544.

Newton, K. J.; Coe, E. H., Jr. Mitochondrial DNA changes in abnormal growth (nonchromosomal stripe) mutants of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 7363-7366.

Newton, K. J.; Gabay-Laughnan, S.; De Paepe, R., Mitochondrial mutations in plants. In *Plant Mitochondria: From Genome to Function*, Day, Ed. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht-Boston, London, **2004**; pp 121-141.

Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; Malfa, S. L.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, 100, 1155-1166.

Nicolosi, E., Origin and taxonomy. In *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, **2007**; pp 19-43.

Nishino, H.; Tokuda, H.; Satomi, Y.; Masuda, M.; Bu, P.; Onozuka, M.; Yamaguchi, S.; Okuda, Y.; Takayasu, J.; Tsuruta, J.; Okuda, M.; Ichiishi, E.; Murakoshi, M.; Kato, T.; Misawa, N.; Narisawa, T.; Takasuka, N.; Yano, M. Cancer prevention by carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 2273-2278.

Noctor, G.; Dutilleul, C.; Paepe, R. D.; Foyer, C. H. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* **2004**, 55, 49-57.

- Ohgawara, T.; Kobayashi, S.; Ohgawara, E.; Uchimiya, H.; Ishii, S.** Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor. Appl. Genet.* **1985**, 71, 1-4.
- Ohgawara, T.; Kobayashi, S.; Ishii, S.; Yoshinaga, K.; Oiyama, I.** Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). *Theor. Appl. Genet.* **1991**, 81, 141-143.
- Ohno, S.**, *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag: Berlin, Allemagne, **1970**; p 160.
- Olivares-Fuster, O.; Duran-Vila, N.; Navarro, L.** Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Rep.* **2005**, 24, 112-119.
- Olivares-Fuster, O.; Hernandez-Garrido, M.; Guerri, J.; Navarro, L.** Plant somatic hybrid cytoplasmic DNA characterization by single-strand conformation polymorphism. *Tree Physiol.* **2007**, 27, 785-792.
- Ollitrault, P.; Serra, D. D. R.**, Citrus crops. In *Amelioration des especes vegetales cultivees: objectifs et criteres de selection.*, **1992**; pp 633-646, 651-653.
- Ollitrault, P.; Jacquemond, C.** Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. *Fruits* **1995**, 49, 398-400.
- Ollitrault, P.; Allent, V.; Luro, F.**, Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen. In *Proceedings of 8th International Citrus Congress. International Society of Citriculture*, Sun City, South Africa, **1996a**; Vol. 2, pp 913-917.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Luro, F.** Somatic hybridization in Citrus: some new hybrids and alloplasmic plants. *Proceeding of International Society of Citriculture* **1996b**, 2, 907-912.
- Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Dambier, D.; Seker, M.** Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae* **2000a**, 157-162.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Cottin, R.** La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **2000b**, 86, 197-221.
- Ollitrault, P.; Vanel, F.; Froelicher, Y.; Dambier, D.** Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Acta Horticulturae* **2000c**, 191-197.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Carreel, F.; D'hont, A.; Luro, F.; Bruyere, S.; Cabasson, C.; Lotfy, S.; Joumaa, A.; Vanel, F.; Maddi, F.; Treanton, K.; Grisoni, M.** Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. *Cah. Agric.* **2000d**, 9, 223-236.

- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Cottin, R.** La diversité des agrumes ; structuration et exploitation par hybridation somatique. *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture* **2001**, 86, 197-221.
- Ollitrault, P.; Jacquemond, C.; Dubois, C.; Luro, F.** Citrus. In *Genetic diversity of cultivated tropical plants*, Perla, Marc, Xavier, Glaszmann, Eds. CIRAD: Montpellier, **2003**; pp 193-217.
- Ollitrault, P.; Guo, W.; Grosser, J. W.**, Somatic hybridization. In *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, **2007a**; pp 235-260.
- Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Dambier, D.; Luro, F.; Yamamoto, M.**, Seedlessness and ploidy manipulations. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, Khan, Ed. Cabi Publishing **2007b**; pp 197-218.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Luro, F.; Froelicher, Y.** Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breed. Rev.* **2008**, 30, 323-352.
- Osborn, T. C.; Pires, J. C.; Birchler, J. A.; Auger, D. L.; Chen, Z. J.; Lee, H. S.; Comai, L.; Madlung, A.; Doerge, R. W.; Colot, V.; Martienssen, R. A.** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* **2003**, 19, 141-147.
- Otto, S. P.; Whitton, J.** Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **2000**, 34, 401-437.
- Pandey, K. K.; Grant, J. E.; Williams, E. G.** Interspecific hybridisation between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Aust. J. Bot.* **1987**, 35, 171-182.
- Parker, R. S.** Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* **1996**, 10, 542-551.
- Pascual, L.; Blanca, J. M.; Canizares, J.; Nuez, F.** Analysis of gene expression during the fruit set of tomato: a comparative approach. *Plant Science* **2007**, 173, 609-620.
- Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrit, P.; Remy, R.; Rousselle; Renard, M.** Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Molecular & General Genetics* **1982**, 191, 244-250.
- Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrit, P.; Remy, R.; Rousselle, P.; Renard, M.** Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **1983**, 191, 244-250.
- Pelletier, G.; Budar, F.** The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, 18, 121-125.
- Pereau-Leroy, R.** Observations sur le pollen des agrumes. *Fruits Outre Mer* **1950**, 5, 290-293.

- Perl, A.; Aviv, D.; Galun, E.** Nuclear-organelle interaction in *Solanum*: interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram. *Mol. Gen. Genet.* **1991**, 228, 193-200.
- Pesaresi, P.; Schneider, A.; Kleine, T.; Leister, D.** Interorganellar communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, 10, 600-606.
- Peter, S.; Spang, O.; Medgyesy, P.; Schafer, C.** Consequences of intergeneric chloroplast transfers on photosynthesis and sensitivity to high light. *Aust. J. Plant Physiol.* **1999**, 26, 171-177.
- Pohlheim, F.** Hybrid variegation in crosses between *Pelargonium zonale* (L.) l'Herit. ex Ait. and *Pelargonium inquinans* (L.) l'Herit. ex Ait. *Plant Breed.* **1986**, 97, 93-96.
- Prakash, S.; Ahuja, I.; Upreti, H. C.; Kumar, V. D.; Bhat, S. R.; Kirti, P. B.; Chopra, V. L.** Expression of male sterility in alloplasmic *Brassica juncea* with *Erucastrum canariense* cytoplasm and the development of a fertility restoration system. *Plant Breed.* **2001**, 120, 479-482.
- Priault, P.; Fresneau, C.; Noctor, G.; Paepe, R. D.; Cornic, G.; Streb, P.** The mitochondrial CMSII mutation of *Nicotiana sylvestris* impairs adjustment of photosynthetic carbon assimilation to higher growth irradiance. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 2075-2085.
- Przywara, L.; White, D. W. R.; Sanders, P. M.; Maher, D.** Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using in ovulo embryo and embryo culture. *Annals of botany* **1989**, 64, 613-624.
- Raghavendra, A. S.; Padmasree, K.** Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* **2003**, 8, 546-553.
- Rao, M. N.; Soneji, J. R.; Chen, C. X.; Huang, S.; Gmitter, F. G., Jr.** Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genetics and Genomes* **2008**, 4, 113-124.
- Rapp, R. A.; Wendel, J. F.** Research review; Epigenetic and plant evolution. *New Phytol.* **2005**, 168, 81-91.
- Rasmussen, G. K.** Seasonal changes in organic acid content of Valencia orange fruit in Florida. *Amer. Soc. Hort. Sci.* **1964**, 84, 181-187.
- Raven, R. H.; Dietrich, W.; Smbbe, W.** An outline of the sytematics of *Oenothera* subsect. *Euoenothera* (*Onagraceae*). *Syst. Bot.* **1979**, 4, 242-252.
- Rhoads, D. M.; Subbaiah, C. C.** Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* **2007**, 7, 177-194.

- Richardson, A. C.; Marsh, K. B.; Macrae, E. A.** Temperature effects on satsuma mandarin fruit development. *J. Hortic. Sci.* **1997**, 72, 919-929.
- Richly, E.; Leister, D.** An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* **2004**, 329, 11-16.
- Rodrigo, M. J.; Alquezar, B.; Zacarias, L.** Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 633-643.
- Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.** Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursor of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2564-2566.
- Sabar, M.; De Paepe, R.; Kouchkovsky, Y.** Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* **2000**, 124, 1239-1250.
- Sadka, A.; Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K. B.** Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol. Plant* **2000**, 108, 255-262.
- Saito, W.; Ohgawara, T.; Shimizu, J.; Ishii, S.; Kobayashi, S.** Citrus cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. *Plant Science (Limerick)* **1993**, 88, 195-201.
- Sakamoto, W.; Kondo, H.; Murata, M.; Motoyoshi, F.** Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. *Plant Cell* **1996**, 8, 1377-1390.
- Saleh, B.; Allario, T.; Dambier, D.; Ollitrault, P.; Morillon, R.** Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* **2008**, 331, 703-710.
- Salmon, A.; Ainouche, M. L.; Wendel, J. F.** Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (*Poaceae*). *Mol. Ecol.* **2005**, 14, 1163-1175.
- Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Ancos, B. D.; Pilar Cano, M.** Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83, 430-439.
- Sandhu, A. P. S.; Abdelnoor, R. V.; Mackenzie, S. A.** Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 1766-1770.
- Scora, R. W.** On the history and origin of citrus *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **1975**, 102, 269-375.

- Sekito, T.; Liu, Z.; Thornton, J.; Butow, R. A.** RTG-dependent Mitochondria-to-Nucleus Signaling Is Regulated by MKS1 and Is Linked to Formation of Yeast Prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell* **2002**, 13, 795–804.
- Shahbazi, M.; Gilbert, M.; Laboure, A. M.; Kuntz, M.** Dual role of the plastid terminal oxidase in tomato. *Plant Physiol.* **2007**, 145, 691-702.
- Shaked, H.; Kashkusk, K.; Ozkan, H.; Feldman, M.; Levy, A.** Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridisation and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* **2001**, 13, 1749–1759.
- Sinclair, W. B.**, *The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits*. The Regents of the University of California ed.; Oakland, California, **1984**; p 946.
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.** Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1993**, 12, 243-273.
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.** Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution *Trends in Ecology and Evolution* **1999**, 14, 348–352.
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Tate, J. A.** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytol.* **2004**, 161, 173-191.
- Spiegel-Roy, P.; Goldschmidt, E. E.**, *Biology of citrus*. Cambridge University Press, **1996**, p 230.
- Spurgeon, S. L.; Porter, J. W.**, *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Porter, J. W. & Spurgeon, S. L. ed.; Wiley, New York, **1981**; Vol. 1, p 1-46.
- Starrantino, A.** Tacle, a new triploid clementine x Tarocco hybrid. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **1999**, 61, 45-47.
- Stern, D. B.; Higgs, D. C.; Yang, J.** Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 308-315.
- Stubbe, W.; Raven, R. H.** A genetic contribution to the taxonomy of *Oenothera* sect. *Oenothera* (including subsection *Euoenothera*, *Emersonia*, *Raimannia* and *Munzia*). *Plant Syst. Evol.* **1979**, 133, 39-59.
- Stubbe, W.; Steiner, E.** Inactivation of pollen and other effects of genome-plastome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Syst. Evol.* **1999**, 217, 259-277.
- Stupar, R. M.; Hermanson, P. J.; Springer, N. M.** Nonadditive expression and parent-of-origin effects identified by microarray and allele-specific expression profiling of maize endosperm. *Plant Physiol.* **2007**, 145, 411-425.

- Sun, Y.; Xue, Q.; Zhang, X.; Ding, C.; Zhang, L.; Gong, M.; Bu, G.; Wang, W.** Morphological, cytological and molecular characterization of a novel symmetric somatic hybrid between *N. tabacum* and *N. glauca*. *Plant Biosyst.* **2007**, 141, 129-133.
- Sundberg, E.; Glimelius, K.** Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Theor. Appl. Genet.* **1991**, 83, 81-88.
- Swingle, W. T.; Reece, P. C.**, The botany of Citrus and its wild relatives. In *The Citrus Industry*, University of California ed. Reuther W., Webber H.J. & Bachelor L.D.: Riverside, California, **1967**; Vol. I, pp 190-430.
- Taiz, L.; Zeiger, E.**, Plant physiology. In Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, Massachusetts, **1998**; p 792.
- Tanaka, T.** Citrologia: semi centennial commemoration papers on citrus studies. Citrologia supporting fondation. Osaka. Japan, **1961**, p 114.
- Tate, J. A.; Ni, Z. F.; Scheen, A. C.; Koh, J.; Gilbert, C. A.; Lefkowitz, D.; Chen, Z. J.; Soltis, P. S.; Soltis, D. E.** Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (*Asteraceae*), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* **2006**, 173, 1599-1611.
- Taylor, M.; Ramsay, G.** Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant* **2005**, 124, 143-151.
- Taylor, W. C.** Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, 40, 211-233.
- Teixeira, R.; Farbos, I.; Glimelius, K.** Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear-mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant J.* **2005a**, 42, 731-742.
- Teixeira, R. T.; Knorpp, C.; Glimelius, K.** Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *J. Exp. Bot.* **2005b**, 56, 1245-1253.
- Thanh, N. D.; Páy, A.; Smith, M. A.; Medgyesy, P.; Márton, L.** Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata*. *Molecular & General Genetics* **1988**, 213, 186-190.
- Thomzik, J. E.; Hain, R.** Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* **1988**, 76, 165-171.
- Tucker, G. A.**, Introduction. In *Biochemistry of fruit ripening.*, Seymour, Taylor, Tucker, Eds. Chapman and Hall: London, United Kingdom, **1993**; pp 1-37.

- Tusa, N.; Bosco, S. F. D.; Nigro, F.; Ippolito, A.** Response of cybrids and a somatic hybrid of lemon to *Phoma tracheiphila* infections. *Hortscience* **2000**, 35, 125-127.
- Tusa, N.; Abbate, L.; Renda, A.; Ruberto, G.** Polyphenols distribution in juices from *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their sexual hybrids. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9089-9094.
- Tusher, V. G.; Tibshirani, R.; Chu, G.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 5116-5121.
- Ungerer, M. C.; Baird, S. J. E.; Pan, J.; Rieseberg, L. H.** Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 11757-11762.
- Upreti, D. C.; Tomar, V. K.** Photosynthesis and drought resistance of *Brassica carinata* and its parent species. *Photosynthetica* **1993**, 29, 321-327.
- Vardi, A.; Breiman, A.; Galun, E.** Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor. Appl. Genet.* **1987**, 75, 51-58.
- Vardi, A.; Arzee-Gonen, P.; Frydman-Shani, A.** Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. *Theor. Appl. Genet.* **1989**, 78, 741-747.
- Varotto, S.; Nenz, E.; Lucchin, M.; Parrini, P.** Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, 102, 950-956.
- Venema, J. H.; Eekhof, M.; Hasselt, P. R. V.** Analysis of low-temperature tolerance of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) cybrid with chloroplasts from a more chilling-tolerant L. hirsutum accession. *Annals of Botany* **2000**, 85, 799-807.
- Vision, T. J.; Brown, D. G.; Tanksley, S. D.** The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science (Washington)* **2000**, 290, 2114-2117.
- Vliet, T. V.; Schaik, F. V.; Schreurs, W. H. P.; Berg, H. V. D.** In vitro measurement of beta-carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on beta-carotene cleavage. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1996**, 66, 77-85.
- Voluevich, E. A.; Buloichik, A. A.** Nucleocytoplasmic interactions in the resistance of wheat to fungal pathogens. V. Quantitative seedling resistance to powdery mildew in alloplasmic lines of the variety Penjamo 62. *Genetika (Moskva)* **1992**, 28, 82-88.
- Wan, J.; Dunning, F. M.; Bent, A. F.** Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct. Integr. Genomics* **2002**, 2, 259-273.

- Wang, J.; Tian, L.; Madlung, A.; Lee, H. S.; Chen, M.; Lee, J. J.; Watson, B.; Kagochi, T.; Comai, L.; Chen, Z. J.** Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* **2004a**, 167, 1961–1973.
- Wang, J. L.; Tian, L.; Lee, H. S.; Wei, N. E.; Jiang, H. M.; Watson, B.; Madlung, A.; Osborn, T. C.; Doerge, R. W.; Comai, L.; Chen, Z. J.** Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* **2006**, 172, 507–517.
- Wang, Y. M.; Lin, X. Y.; Dong, B.; Wang, Y. D.; Liu, B.** DNA methylation polymorphism in a set of elite rice cultivars and its possible contribution to inter-cultivar differential gene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters* **2004b**, 9, 543–556.
- Wendel, J. F.** Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* **2000**, 42, 225–249.
- Wolfe, K. H.** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Review Genetic* **2001**, 2, 333–341.
- Wolters, A. M. A.; Koornneef, M.; Gilissen, L. J. W.** The chloroplast and mitochondrial DNA type are correlated with the nuclear composition of somatic hybrid calli of *Solanum tuberosum* and *Nicotiana plumbaginifolia*. *Curr. Genet.* **1993**, 24, 260–267.
- Woodson, J. D.; Chory, J.** Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, 9, 383–395.
- Wu, Z.; Luo, J.; Ge, Q.; Zhang, D.; Wang, Y.; Jia, C.; Lu, Z.** Allele-specific extension on microarray for DNA methylation analysis *Anal. Chim. Acta* **2007**, 603, 199–204.
- Xu, X. Y.; Liu, J. H.; Deng, X. X.** Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplasm-protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **2006**, 25, 533–539.
- Yamamoto, M.; Kobayashi, S.; Nakamura, Y.; Yamada, Y.** Phylogenetic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japanese Journal of Breeding* **1993**, 43, 355–365.
- Yamamoto, M.; Matsumoto, R.; Okudai, N.; Yamada, Y.** Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Hort.* **1997**, 70, 9–14.
- Yano, M.** Cancer prevention by citrus. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* **2002**, 49, 139–144.
- Yao, J. L.; Cohen, D.; Rowland, R. E.** Inheritance and Plastome Genome Incompatibility in Interspecific Hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). *Theor. Appl. Genet.* **1994**, 88, 255–260.
- Yao, J. L.; Cohen, D.; Rowland, R. E.** Interspecific Albino and Variegated Hybrids in the Genus *Zantedeschia*. *Plant Science* **1995**, 109, 199–206.

- Yao, J. L.; Cohen, D.** Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, 101, 400-406.
- Yu, J.; Wang, J.; Lin, W.; Li, S.; Li, H.; Al., E.** The genomes of *Oryza sativa*: A history of duplications. *PLoS Biol.* **2005**, 3, e38.
- Zhang, A.; Yu, F.; Zhang, F.** Alien cytoplasm effects on phytosiderophore release in two spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* **2003**, 50, 767-772.
- Zhang, J. F.; Turley, R. B.; Stewart, J. M.** Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. *Plant Cell Rep.* **2008**, 27, 553-561.
- Zhou, A.; Xia, G.; Chen, H.; Hu, H.** Comparative study of symmetric and asymmetric somatic hybridization between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Science in China Series C - Life Sciences* **2001**, 44, 294-304.
- Zubko, M. K.; Zubko, E. I.; Patskovsky, Y. V.; Khvedynich, O. A.; Fisahn, J.; Gleba, Y. Y.; Schieder, O.** Novel 'homeotic' CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*. *J. Exp. Bot.* **1996**, 47, 1101-1110.
- Zubko, M. K.; Zubko, E. I.; Ruban, A. V.; Adler, K.; Mock, H. P.; Misera, S.; Gleba, Y. Y.; Grimm, B.** Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. *Plant J.* **2001**, 25, 627-639.
- Zubko, M. K.; Zubko, E. I.; Gleba, Y. Y.** Self-fertile cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus aureus*) with a nucleo-plastome incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* **2002**, 105, 822-828.
- Zubko, M. K.** Mitochondrial tuning fork in nuclear homeotic functions. *Trends Plant Sci.* **2004**, 9, 61-64.

VI. ANNEXES

Tableau 13: Gènes surexprimés chez WLM + EUR 2x comparés au citronnier Eureka

Gene ID	Nom	Description
C34108D02	AT4G25030	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MFC19
C32007F07		no_annotation_available
C31801G06	AT2G45960	Plasma membrane aquaporin
C04011B01	AT2G05710	Aconitase-iron regulated protein 1
C31502B11	AT4G00430	Aquaporin
C34007D01	AT4G32940	Vacuolar processing enzyme precursor
KN0AAP9YG14		no_annotation_available
C08036B08	AT1G08970	CONSTANS interacting protein 2b
C06052G12	AT2G37250	Probable adenylate kinase 1, chloroplast precursor
C01019D09	AT4G36920	PHAP2B protein
C32107F04	AT4G34050	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2
C05076B02	AT4G35040	Transcription factor-like
C16017G06	AT1G52720	F6D8.3
C31101A02	ATCG00490	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor
C02001A04	AT1G50010	Tubulin alpha-2 chain
C31008F07	AT5G65730	Xyloglucan endotransglycosylase
C20003E08	AT5G01600	Ferritin-3, chloroplast precursor
C06054A08	AT5G38710	Proline dehydrogenase
C31809H06	AT2G16990	At2g16980
C04026C09	AT5G24470	Two-component response regulator-like APRR5
C31810E02	AT4G23860	Putative mlo2 protein
C16015C04	AT1G46768	Dehydration responsive element binding protein
C01020B10		Abscisic stress ripening-like protein
C06006A12	AT2G45560	Putative ripening-related P-450 enzyme
C01001D04		no_annotation_available
C34104D01		no_annotation_available
C31807F07	AT4G08550	Glutaredoxin-related-like protein
C31801C05	AT5G01410	Pyridoxine biosynthesis protein
C06008D08	AT4G14690	Light induced protein like
C31604C08	AT1G20693	F2D10.18
C32004G10	AT1G33110	Protein At1g33110
C01010H01		no_annotation_available
C31603A09	AT1G73230	Putative transcription factor BTF3
C31804F11	AT5G35530	"Putative 40S ribosomal protein; contains C-terminal domain"
C07007E08	AT2G47690	Fb14
C34204D09	AT1G07140	Ran-binding protein 1 homolog a
C32107G12	AT2G22170	Elicitor-inducible protein EIG-J7
C31101E11		Ac transposase-like protein
C01018E07	AT4G27435	Fiber protein Fb34
C31108H09	AT5G25280	Serine-rich protein
KN0AAI2BE07		no_annotation_available
C01002B06	AT5G61590	Ethylene-responsive element binding factor
C16017E04	AT1G33270	At1g33270
C34104D07	AT4G00430	Aquaporin
C05138D10	AT1G28480	F3M18.8
C06004A12	AT1G55255	Expressed protein
C31802C03	AT3G14200	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, P1 clone: MAG2
C34110C03	AT2G02170	Expressed protein

Gene ID	Nom	Description
C08034E08	AT4G10040	Cytochrome c
C05141A05	AT1G58030	Fiber protein Fb12
IC0AAA70CH07	AT2G44120	60S ribosomal protein L7 (RPL7C)
C31501H10	AT1G52870	Putative peroxisomal membrane protein
IC0AAA17DC11	AT1G32640	Phaseolin G-box binding protein PG1
C08020E04	AT4G18040	Eukaryotic translation initiation factor 4E
C31602G06	AT4G00050	Putative bHLH transcription factor bHLH016
KN0AAP2YJ08		no_annotation_available
C34005H01	AT5G50370	Adenylate kinase B
IC0AAA41CH10		no_annotation_available
C34005G11	AT2G27710	60s acidic ribosomal protein
C34001D01	AT2G24260	BHLH transcription factor PTF1-like protein
C31010E11	AT2G16990	At2g16980
C06018E09	AT4G33865	Ribosomal protein S29
C01020G07	AT2G43420	Putative sterol dehydrogenase
C05807B08	AT3G16510	SRC2
C01004F09	AT5G18070	Probable phosphoacetylglucosamine mutase
C04023E06	AT5G04930	Phospholipid-transporting ATPase 1
C31009D08	AT5G65430	14-3-3-like protein B
C08009D01		no_annotation_available
C08004G06	AT1G12200	T28K15.7 protein
C34202E04	AT4G38960	Putative CONSTANS-like B-box zinc finger protein
C31403D09	AT2G39270	OSJNBa0043A12.38 protein
C31704F10		no_annotation_available
C05070D02	AT3G62290	ADP-ribosylation factor
C31303E12	AT1G69840	Hypersensitive-induced response protein
C31706D08	AT2G44870	Expressed protein
C31605D02	AT1G51200	Zinc-finger protein
C02006G08	AT4G37830	Putative cytochrome c oxidase subunit VIa
C01008E03	AT3G48590	Nuclear transcription factor Y subunit C-1
C31801D08	AT1G08820	F22O13.31
C08037B08	AT3G20770	EIN3-like protein
C31204F01	AT2G43060	no_annotation_available
C32108C11	AT1G28400	no_annotation_available
C06013B08	AT2G01670	MutT-like protein
C31103A09	AT2G37150	Protein containing C-terminal RING-finger
C08030F12	AT1G13950	Eukaryotic translation initiation factor 5A
C05811F09	AT3G50120	no_annotation_available
C06006A02		no_annotation_available
KN0AAI1DB02		no_annotation_available
C34004B06		no_annotation_available
C34206A03	AT4G36760	AT3g05350/T12H1_32
C31009F07	AT5G25610	RD22-like protein
C34005E11	AT1G23150	T26J12.8 protein
C31008G10	AT4G15093	Putative dioxygenase
C31401B10	AT1G02780	60S ribosomal protein L19
C19005A01	AT1G10370	no_annotation_available
C31405B10	AT3G25520	60S ribosomal protein L5
C31701G01	AT2G28060	Putative AKIN beta3
C31402F01	AT5G14670	ADP-ribosylation factor
C16016C04	AT1G21650	Preprotein translocase, SecA subunit
C03004E04	AT1G44910	Formin binding protein 3-like
KN0AAL3CG12	AT1G04985	F13M7.2 protein

Gene ID	Nom	Description
C34005H02	AT5G52650	40S ribosomal protein S10-like
C01010E11	AT2G26580	YABBY2-like transcription factor YAB2
C31006H06	AT3G48330	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
C06006A01	AT3G17020	Gb AAF26101.1
C31107H10	AT1G03070	Putative receptor associated protein
C08011C02		no_annotation_available
C31108C02	AT1G26910	60S ribosomal protein L10
C34204E07	AT5G54750	Transport protein particle component Bet3p-like protein
C05002F08	AT5G53560	Cytochrome b5 isoform Cb5-A
C20008H12	AT3G12490	Cysteine proteinase inhibitor
C01015B06	AT2G23600	Ethylene-induced esterase
C32010F07	AT5G67500	VDAC2.1
C32202G05	AT5G02560	Putative histone H2A
C08031B08	AT5G22440	60S ribosomal protein L10a-3
C31702A12	AT4G18910	Nodulin26-like major intrinsic protein
C31602E12	AT1G26550	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
C18019F06	AT4G15000	60S ribosomal protein L27
C32003A04	AT4G32020	expressed protein, NuLL
C32202G04		no_annotation_available
C32103B07	AT5G50570	Teosinte glume architecture 1
C08034H05	AT5G52040	Splicing factor-like protein
C04026D03		no_annotation_available
C32011B09	AT1G19300	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231
C31801G12	AT2G33120	Synaptobrevin-like protein
C34103F01	AT4G09800	40S ribosomal protein S18
C07010B03	AT2G05620	Expressed protein
C04017G12	AT5G45775	60S ribosomal protein L11-1
C31501E05	AT5G57660	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 5
C06006C06	AT4G29510	Arginine methyltransferase pam1
C01014B10	AT1G76860	no_annotation_available
C32005F03	AT3G45600	Similarity to senescence-associated protein
C07006D03	AT1G15100	RING-H2 zinc finger protein RHA2a
C08018F03	AT1G05570	F3F20.1 protein
IC0AAA56DE01*		
C32013F11	AT2G28190	Chloroplast Cu/ZnSOD
C06017A03	AT2G32060	Putative ribosomal protein S12
C31109F02	AT2G40830	Expressed protein
C31605G06	AT1G20580	Small nuclear ribonucleoprotein, putative
C31303B02	AT1G27730	Zinc-finger protein 1
C01006D09	AT1G65700	At1g65700/F1E22_3
C03004H04	AT4G17530	"UPI000009DA03; putative GTP-binding protein"
C07002C09	AT4G27500	Proton pump interactor
C34006E09	AT2G24590	Putative splicing factor RSZp22
C31502B06	AT2G41710	Putative AP2 domain transcription factor
C31505E06	AT3G60690	Putative auxin-regulated protein
C08025D07	AT4G32610	Expressed protein
IC0AAA53CH10	AT5G04480	AT5g04480/T32M21_80
C31403C10	AT3G27080	Mitochondrial import receptor subunit TOM20
C34206D02	AT3G02090	Mitochondrial processing peptidase beta subunit
C31605E03	AT3G49930	Zinc finger DNA-binding protein
C32103A02	AT4G25050	Acyl carrier protein 1, chloroplast precursor
C31703D04	AT5G47310	Similarity to EREBP-4
C07008B12	AT2G46210	Protein At2g46210

Gene ID	Nom	Description
C20001G09		no_annotation_available
C08005E12		no_annotation_available
KN0AAP3YF04#		
C20005A06	AT1G09310	T31J12.3 protein
C03008G04	AT5G48480	Early tobacco anther 1
KN0AAP5YI03		no_annotation_available
C31203B05	AT5G01750	F14M2.3 protein
C31403G05	AT1G21550	"UPI0000162E68; F24J8.15 protein"
C08038B07	AT2G01190	Expressed protein
C31707D04	AT5G53370	Pectinesterase
C31106C08	AT1G17100	SOUL-like protein
C03006G03	AT4G21270	Kinesin-1
C34201B11	AT5G10360	40S ribosomal protein S6-1
C07008A03	AT1G28330	Auxin-repressed protein-like protein ARP1
C01013C06	AT5G27430	Putative signal peptidase
C34201F01	AT3G10300	Expressed protein
C31301F02		no_annotation_available
C31801H12	AT3G53020	60S ribosomal protein L24
C34001C07	AT5G50370	Adenylate kinase B
C07008D01	AT1G68370	Chaperone protein dnaJ 15
IC0AAA76DC07		Prpd protein
C06007E06	AT1G73390	F2H15.16
C03007B07	AT1G66480	At1g66480
C06019H03	AT2G03870	Putative snRNP splicing factor
IC0AAA22DH03*		
C04004C09	AT1G54410	COR15
C02025C01	AT5G22330	Putative Ruv DNA-helicase
C04017G03	AT2G27510	Non-photosynthetic ferredoxin precursor
C31601B11	AT3G16640	Translationally-controlled tumor protein homolog
C31604G09	AT5G59613	Mitochondrial ATP synthase 6 KD subunit
C31504H10	AT4G04955	Putative allantoinase
KN0AAP8YC14	AT2G43240	"nucleotide-sugar transporter family protein, weak similarity to SP:P78382 CMP-sialic acid transporter Homo sapiens; contains Pfam profile PF04142: Nucleotide-sugar transporter"
C31808F01	AT5G60670	60S ribosomal protein L12
C05070G03	AT3G47370	40S ribosomal protein S20
KN0AAH1DH06	AT1G15380	lactoylglutathione lyase
C32201F11	AT4G25890	Putative acidic ribosomal protein
C31305H02		no_annotation_available
C05072E07		no_annotation_available
C18004C08	AT1G48790	At4g16144
C20006C06	AT5G50870	Ubiquitin conjugating enzyme
C34208H12	AT1G79590	Syntaxin 51
C01008C04	AT5G16780	SART-1 family protein, contains Pfam domain, PF03343: SART-1 family
C04035E05	AT3G05890	Clit1
C18023A01		no_annotation_available
C05074A01		no_annotation_available
C04006H04	AT5G49710	Protein At5g49710
C31701G12	AT3G22110	Proteasome subunit alpha type 4
C34209H10	AT5G08740	NADH dehydrogenase-like protein
C02016B12	AT3G50590	"transducin family protein / WD-40 repeat family protein, contains 3 WD-40 repeats (PF00400); some similarity to s-tomosyn isoform (GI:4689231)(Rattus norvegicus); contains non-

Gene ID	Nom	Description
		consensus AT-AC splice sites at intron 18 "
C31502H06	AT1G02930	Glutathione S-transferase
C01019G09	AT1G52140	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 146
C31706C09	AT5G61170	40S ribosomal protein S19-1
C04016F07	AT5G40370	Glutaredoxin
C02006A12		no_annotation_available
C05139H03	AT4G02260	RelA-SpoT like protein RSH1
C05134E07	AT3G62630	expressed protein
C31208G03	AT5G18520	Putative lung seven transmembrane receptor 1
C05068E02	AT1G68020	"Putative trehalose-6-phosphate synthase; 46897-44149"
C34101E05	AT5G02040	"UPI000009E851; P0005H10.15"
C20003E11	AT5G53045	expressed protein
C31802B10	AT5G56670	40S ribosomal protein S30
C04002H02		no_annotation_available
C05054E07	AT5G12200	Dihydropyrimidinase
C06010A09	AT4G29670	Splice isoform 2 of Q8LCT3
C32003G11	AT1G63290	Putative D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase
KN0AAK2AE05	AT1G54410	COR15
C31704A10	AT3G62120	Multifunctional aminoacyl-tRNA ligase-like protein
C31202C05	AT3G13550	Constitutive photomorphogenesis protein 10
C31108E06	AT5G20010	GTP-binding nuclear protein Ran-1
C31305B10	AT5G26710	Putative multifunctional amino acid-tRNA ligase
C31405G10	AT1G78870	At1g78870/F9K20_8
C31402G04	AT5G28840	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein-like protein
C31003B12	AT1G62290	Aspartic proteinase 2
IC0AAA26DH06	AT5G05750	Putative DnaJ protein
C05071H08	AT4G33060	Multidomain cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
C08018G06	AT5G42190	Skp1
C01020G06	AT2G47620	no_annotation_available
C04006C03	AT2G21660	Glycine-rich RNA-binding protein
C05073F12	AT3G53140	Caffeic acid O-methyltransferase-like protein
C31304E10	AT5G58240	At5g58240
C31200A06	AT5G08680	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor
C34104B01	AT5G52650	40S ribosomal protein S10-like
C31402E11	AT1G75270	Dehydroascorbate reductase
C04006B04	AT5G59890	Actin-depolymerizing factor 1
C32012H01	AT1G16180	T24D18.26 protein
C31603D03	AT5G64760	Proteasome regulatory subunit-like
IC0AAA85BB09	AT1G29280	WRKY-A1244
C04027F10	AT2G30070	KUP-related potassium transporter
C34208E06	AT5G52060	OSJNBa0058K23.16 protein
C20006H02	AT5G22460	Gb AAF31728.1
C31810B09	AT1G29280	Putative WRKY transcription factor
C31305H01	AT1G25682	Nuclear protein-like
C04004D02	AT2G18110	Translational elongation factor 1 subunit Bbeta
IC0AAA56DF02	AT1G68220	T6J4.13 protein
IC0AAA35AA09	AT5G14740	Carbonic anhydrase
C34105B08	AT2G18040	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1
IC0AAA52BD02	AT4G24040	Trehalase 1 GMTRE1
C04013A12	AT3G53740	Ribosomal protein L36
C34207E07	AT4G04860	Derlin2-2

Gene ID	Nom	Description
C01019F02	AT4G28290	no_annotation_available
IC0AAA93BF12*		
C31009E09	AT1G62250	F19K23.17 protein
C32202C07	AT2G23090	Expressed protein
C34205C03	AT4G30470	Cinnamoyl-CoA reductase-like protein
C04022C06		no_annotation_available
C34103D10	AT5G59310	Lipid-transfer protein
C05057H09	AT1G55670	Photosystem I reaction center subunit V, chloroplast precursor
C07004C07	AT1G32470	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial precursor
C05131H11	AT5G04750	no_annotation_available
C06009B06	AT5G24510	60s acidic ribosomal protein P1
C31403B04	AT1G54410	COR15
C08005E05		no_annotation_available
C04002F08	AT5G42220	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, TAC clone:K5J14
C05132D02		Ripening-related protein grip22 precursor
C08005C06	AT2G01320	Protein At2g01320
C01019H05	AT3G25410	Bile acid:sodium symporter-like
C08004H10	AT1G23290	60S ribosomal protein L27a-1
C02023A03	AT4G18060	AT4g18060/F15J5_30
C34107H11	AT3G44100	F26K24.7 protein
IC0AAA41DB10	AT3G61470	Chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplast precursor
C32202F03	AT1G27950	Putative lipid transfer protein GPI-anchored
C04031B05	ATMG00570	MttB protein
C32010E02	AT4G30920	Leucine aminopeptidase 3, chloroplast precursor
C08011H05	AT3G22190	Similarity to SF16 protein
C32101E04	AT1G76860	Small nuclear ribonucleoprotein-like
C31103C09	AT2G38290	Ammonium transporter
C07003A09		no_annotation_available
C05133H03	AT4G25490	no_annotation_available
C31402B03	AT3G56340	Ribosomal protein S26
C05802G09	AT1G70180	OSJNBa0060P14.15 protein
C31604B03	AT5G58740	Nuclear movement protein-like
IC0AAA87AF09	AT4G14590	EMB2739 expressed protein
C01015H08	AT3G24730	At3g24730
C20006E06	AT5G13450	ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor
C31303E10	AT5G10770	AT5g10770/T30N20_40
C02002H10		no_annotation_available
C31303E01	AT1G57660	60S ribosomal protein L21
C02009F06	AT4G35580	NAM / CUC2-like protein
C31403A09	AT1G21720	Proteasome subunit beta type 3-A
C18023B07	AT5G63640	Gb AAF26070.1
C03006C08	AT1G65720	F1E22.9
C31602G01	AT1G15140	Protein At1g15140
C07009D08	AT2G38140	30S ribosomal protein S31
C34205F01	AT1G12310	Putative serine/threonine kinase
C31401C07	AT1G30320	OSJNBa0058K23.18 protein
C34009C03	AT4G01050	Putative protein At4g01050
C34004A04	AT1G02170	Metacaspase 1
C31601A01	AT1G23200	Pectinesterase-2 precursor
C31810E12	AT4G07390	Putative Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein homolog
KN0AAP4YA14#		
C31204A11	AT1G17080	F20D23.22 protein
C07008E01		no_annotation_available

Gene ID	Nom	Description
C04030B05		no_annotation_available
C31605H06	AT4G00100	40S ribosomal protein S13-1
C32202E05	AT3G44590	60s acidic ribosomal protein
KN0AAQ5YJ22	AT5G12370	Exocyst complex component 5
C16018C06	AT5G57330	Putative apospory-associated protein C
C16016E08	AT4G22950	MADS-box protein PTM5
C32202A01	AT1G54680	T22H22.11 protein
C31802G06	AT2G33610	Putative SWI/SNF complex subunit SW13
C18015E04	AT5G18130	no_annotation_available
C16015C12	AT5G60920	Phytochelatin synthetase-like protein
C07004F04	AT5G58240	ATPase-like protein
C06020H08	AT3G51630	Mitogen-activated protein kinase
KN0AAP2YC04#		
C08031E06	AT3G13227	no_annotation_available
C34104C12	AT5G02960	40S ribosomal protein S23-1
IC0AAA31DE11	AT3G12130	no_annotation_available
IC0AAA43DF05*		
C31001B11	AT5G60660	MipC
C01014H01		no_annotation_available
C01014G02		no_annotation_available
C34009C08	AT5G38470	RAD23 protein
C31809H08	AT1G64230	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 10/12
C01009E09	AT1G32080	"UPI00000ABBD8; P0520B06.24"
C07003G02	AT4G15530	Pyruvate, phosphate dikinase, chloroplast precursor
C34105H08	AT5G24510	60S acidic ribosomal protein P1
C31009H07	AT3G61870	Protein At3g61870
C04002A05		no_annotation_available
C31100E08	AT4G26670	AT4g26670/F10M23_10
C31706B07	AT3G57300	Helicase-like protein
IC0AAA16DF08	AT4G28390	ADP/ATP translocase
C08036D09	AT3G12630	Pathogenesis-related protein-like protein
C05132B09	AT4G16820	Triacylglycerol lipase like protein
C32004G01	AT4G28390	Putative ADP,ATP carrier-like protein
C16013H05		no_annotation_available
C31503G07		no_annotation_available
IC0AAA42BG08	AT1G48920	Pisum sativum L
C06007F06	AT5G27700	40S ribosomal protein S21-2
C06014B12		no_annotation_available
C31209D01	AT5G18900	Prolyl 4-hydroxylase alpha subunit-like protein
C02016B03	AT1G51060	Protein H2A
KN0AAA1AF04		no_annotation_available
C16018B10	AT3G13790	Cell wall invertase precursor
KN0AAA3BD01%		
C31705G10		no_annotation_available
IC0AAA88AA07	AT5G53480	Importin beta
C31703E09	AT2G31060	Putative GTP-binding protein
C31601H03	AT5G42650	Hydroperoxide lyase
C06007D02		Nam-like protein 2
C08039F05	AT3G49010	60S ribosomal protein L13
C05056E03		no_annotation_available
KN0AAL2BE11	AT5G20885	AT5g20880/F22D1_50
C32202G10	AT5G20180	Putative ribosomal protein
C02013D08	AT1G70600	60S ribosomal protein L27a-2

Gene ID	Nom	Description
C34001C10	AT3G44110	DnaJ-like protein MsJ1
C06020E02		no_annotation_available
KN0AAP11YC15	AT3G10950	60S ribosomal protein L37a
C01008D06		no_annotation_available
IC0AAA63AF07		no_annotation_available
C01018F09	AT2G33150	Acetyl-CoA C-acyltransferase
IC0AAA7AC03	AT1G10580	T10O24.21
IC0AAA44BE11		Related to beta-1, 3-glucan binding protein
C08013C06		no_annotation_available
C31404A06	AT3G12120	Delta-12 fatty acid desaturase
C01001E07	AT5G10980	Histone H3.3
IC0AAA26CE05		no_annotation_available
IC0AAA77DG09	AT2G17975	Predicted protein
C31206E04	AT1G24020	Pathogenesis-related protein PR10A
C04011H05	AT5G13540	Protein At5g13540
C08023E06		no_annotation_available
C34202B11	AT5G33320	Triose phosphate/phosphate translocator, non-green plastid, chloroplast precursor
C05802F08		no_annotation_available
C34110B03	AT1G64230	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 10/12
C03006F04	AT4G21150	AT4g21150/F7J7_90
IC0AAA89AE09		no_annotation_available
C06022E07	AT2G35940	Bell-like homeodomain protein 2
C32105C04	AT5G43330	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
C05074G02	AT3G56680	T7M13.15 protein
IC0AAA34BA06	AT1G50620	Similarity to bactericidal permeability-increasing protein
C31603A10	AT3G18830	Sorbitol transporter
C05136H05	AT2G45300	5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase
C06024B10	AT1G26340	Cytochrome b5 isoform Cb5-D
C05002B01	AT3G19000	Oxylase-like protein
C08036C05	AT3G02790	Zinc finger protein-like
C05801G02	AT4G03280	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor
IC0AAA68CD12	AT4G38680	Glycine-rich protein 2
C34202E06	AT1G50640	Ethylene-responsive transcription factor 3
KN0AAB2AF08	AT1G79200	YUP8H12R.20
C31604G11	AT4G38970	Plastidic aldolase
C20010E08	AT4G30010	Fiber protein Fb15
C34009D09	AT5G51570	Gb AAF03497.1
IC0AAA30AB03		no_annotation_available
C06018E11	AT2G02760	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 1
C07008D12	AT3G61460	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (BRH1), identical to BRH1 RING finger protein (Arabidopsis thaliana) GI:4689366; identical to cDNA BRH1 RING finger protein, GI:4689365 chr3:22752486-22753259 REVERSE Alia"
C01006H03	AT3G57490	40S ribosomal protein S2 homolog
IC0AAA69BE09	AT2G45290	Transketolase
C01011D07	AT3G14080	Sm protein, putative
C07005A04	AT4G24750	At4g24750
C05074G12	AT2G03120	Expressed protein
C04002B05	AT2G46225	Protein ABIL1
C31102G04	AT3G18830	Sorbitol transporter
C31707G09	AT2G21180	Expressed protein
C08014B01	AT1G76200	BLE1 protein

Gene ID	Nom	Description
C04026F03		no_annotation_available
C07003B11	AT2G14045	Putative c-myc binding protein
C05001B05	AT1G54290	SUI1 protein
C31502C05	AT1G68010	Hydroxypyruvate reductase
C06017D02	AT5G05370	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex ubiquinone-binding protein QP-C
C31601A12	AT2G05100	Chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplast precursor
C20005G09	AT5G53480	no_annotation_available
C06018B03	AT5G02502	Gb AAF23278.1
C06012C02	AT2G39390	60S ribosomal protein L35
C05076H08	AT4G39780	no_annotation_available
C01020A12	AT3G24590	Putative signal peptidase I
C05808A01	AT5G01960	P0028E10.20 protein
C20007G07	AT2G27500	Protein At2g27500
C06004H01		no_annotation_available
IC0AAA98DB10	AT1G31930	G-protein alpha subunit, putative
C31701B10	AT2G05840	Proteasome subunit alpha type 6
C05131H08	AT3G27880	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 3, TAC clone: K16N12
C31100A08	AT4G34050	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 2
C06013E10	AT1G15120	Putative ubiquinol--cytochrome-c reductase
C05138G04	AT4G12800	Photosystem I subunit XI
IC0AAA40AC01	AT1G30820	Putative CTP synthetase
C31810H06	AT4G35000	Peroxisomal ascorbate peroxidase
C07002E04	AT4G34160	NtcycD3-1 protein
C31702A09	AT1G26880	60S ribosomal protein L34
C32007B02	AT4G06744	no_annotation_available
C34207A11	AT5G11770	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit, mitochondrial precursor
C16015E11	AT5G48810	no_annotation_available
KN0AAP4YE05		no_annotation_available
C31704G03	AT1G29050	Expressed protein
C01014C09		no_annotation_available
C31304G09	AT5G49840	CLP protease regulatory subunit CLPX-like
C04013C01	AT2G29490	Putative glutathione S-transferase T3
IC0AAA46AH09		"UPI00005A3E5A; PREDICTED: similar to Ornithine decarboxylase antizyme (ODC-Az)"
C34006D02	AT4G04020	Plastid-lipid associated protein, chloroplast precursor
C05071C02	AT4G28590	expressed protein
C08032C01	AT1G08680	ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZiGA4
C34005H07	AT3G48770	Expressed protein
C34001D09	AT5G15610	OSJNBa0068L06.12 protein
C04022A12	AT5G20620	Polyubiquitin
C31303F07	AT2G30860	Glutathione S-transferase GST 22
C08005B04	AT3G06610	"DNA-binding enhancer protein-related, similar to huntingtin interacting protein HYPK (GI:3329429) (Homo sapiens); identical to Egd2p (GI:172043) (Saccharomyces cerevisiae) similar to EGD2 protein (GAL4 DNA-binding enhanc"
C01014B04	AT4G15560	1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase
C34210H04	AT2G42590	14-3-3-like protein D
C31602H03	AT4G28640	Aux/IAA protein
C32202D09	AT3G04040	At3g04040
C31006G07	AT4G03280	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor
C03004F07		no_annotation_available

Gene ID	Nom	Description
C34003G07		no_annotation_available
C04011A07	AT1G55120	Cell wall apoplastic invertase
IC0AAA46BB08	AT4G36520	trichohyalin-related, low similarity to SP:Q07283 Trichohyalin Homo sapiens
C02018F01	AT3G04920	40S ribosomal protein S24
C20006A06	AT5G16050	14-3-3 protein
C03006E02	AT1G30240	no_annotation_available
C31809B07	AT4G20330	Putative Transcription initiation factor IIE, beta subunit
C31601E05	AT1G23440	Pyrrolidone carboxyl peptidase-like protein
C05809C10		COR15
C07006B02	AT2G28900	Pom14 protein
C04010B07	AT5G20290	40S ribosomal protein S8
C31602D01	AT3G06170	At3g06170
C02011C08	AT1G64520	26S proteasome subunit RPN12
C01017G10	AT3G50560	AT3g50560/T20E23_160
C31701C02	AT4G11010	Nucleoside diphosphate kinase III, chloroplast/mitochondrial precursor
C18014C11	AT1G79190	YUP8H12R.20
C31402D09	AT5G55630	Outward-rectifying potassium channel KCO1
C31209C03	AT4G16190	Cysteine proteinase precursor
C02006C06	AT3G55260	Beta-N-acetylhexosaminidase-like protein
C02010B08	AT5G55610	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MDF20
C01003E03	AT3G09850	F8A24.10 protein
C31701H04	AT3G47470	Chlorophyll a/b-binding protein
C32004D05	AT5G59910	Histone H2B
C31403G09	AT2G25737	Membrane protein-like
C02022G09	AT2G40300	Ferritin-2, chloroplast precursor

Tableau 14: Gènes réprimés chez WLM + EUR 2x comparés au citronnier Eureka

Gene ID	Gene Name	Description
KN0AAP12YA02		no_annotation_available
C31304G07	AT1G36050	OSJNBa0006M15.17 protein
C31305E03	AT1G56170	CCAAT-box binding factor HAP5 homolog
C34108H02	AT2G41380	Putative embryo-abundant protein
C31206H01	AT5G17540	Anthraniloyl-CoA: methanol anthraniloyl transferase
C03005B04	AT1G71691	Protein At1g71691
C31404C01	AT1G49010	F27J15.20
IC0AAA39CG02	ATMG00560	70s mitochondrial ribosomal protein L2
C20001F02	AT5G43920	WD-repeat protein-like
C34103D09	AT5G02580	At5g02580
C02009D08	AT2G26790	Putative salt-inducible protein
IC0AAA69DF10		Aminopeptidase Y, putative
KN0AAI1DC10		
C05073C09	AT4G03230	Putative receptor kinase
IC0AAA92BF03		no_annotation_available
KN0AAL3BB11	AT1G80930	F23A5.29 protein
IC0AAA17DD12	AT5G10080	80A08_5
C20009A07	AT3G06350	3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase isoform 2
C34205E11	AT1G74960	Plastid 3-keto-acyl-ACP synthase II-B
C31209G11		no_annotation_available
KN0AAL2BA07	AT2G01060	Putative transfactor
C18010G10		no_annotation_available
C05075G06		no_annotation_available
IC0AAA58BG11	AT4G36220	Ferulate 5-hydroxylase
C34209G12	AT3G61060	Protein At3g61060
KN0AAA1BC08		no_annotation_available
C16015H05		no_annotation_available
C06009A09		no_annotation_available
IC0AAA62BG01	AT1G47840	Hexokinase
C08003C06		no_annotation_available
C34210C08	AT1G71840	F14O23.22 protein
C34006F03		no_annotation_available
C02008E05	AT2G47940	Protease Do-like 2, chloroplast precursor
C08010B11		no_annotation_available
C31207B11		no_annotation_available
C31207E10	AT3G09840	Cell division control protein 48 homolog E
IC0AAA64DD09		no_annotation_available
C31304E03	AT1G09980	ZW18 protein
KN0AAP5YK14	AT4G01900	PII protein

Implications of nucleo-cytoplasmic interactions and allopolyploidization on phenotypic and genomic expression in citrus.

Somatic hybridization by protoplast fusion is an important tool of citrus improvement programs around the world and particularly those developed by CIRAD in Corsica. These strategies of ploidy manipulation raise new research questions regarding the phenotypic and genomic expression of polyploid citrus. The objective of this thesis is (i) to determine the impact of nucleo-cytoplasmic interactions on the phenotype of diploid somatic hybrids (cybrids), particularly on criteria of fruit quality, and (ii) to analyze the inheritance of phenotypic characters under allotetraploidization in relation with possible neoregulation of genomic expression. The approach is (i) molecular (nuclear and chloroplast SSR and mitochondrial PCR markers) and pomological description of two parents with very contrasting phenotypic characters (mandarin Willow leaf (WLM) and Eureka lemon (EUR)) and their somatic hybrids diploid and tetraploid; (ii) qualitative and quantitative analysis of compounds involved in fruit quality (sugars, organic acids, aromas and carotenoids) by HPLC; (iii) an analysis of expression of genes involved in the biosynthetic pathway of carotenoids by real-time PCR. This work is complemented by a global analysis of the transcriptome with a 20K cDNA microarray developed by the Citrus Functional Genomic Project in Spain.

Analysis of nuclear and cytoplasmic genomes permitted to characterize a cybrid with nucleus and chloroplasts of lemon plus mitochondria of mandarin, and a tetraploid somatic hybrid resulting from the addition of the nuclear genomes of both parents combined with cytoplasmic organelles of mandarin.

Morphological and biochemical characterization of the cybrid WLM + EUR 2x has shown that the interaction between lemon-nucleus and mandarin-mitochondria affects very slightly the phenotype. However, leaf transcriptome analysis of the cybrid shows an alteration of expression profile of nuclear genes involved in a wide range of metabolic process.

For the somatic allotetraploid hybrid most phenotypic characters showed dominance of one of the parent. Thus, there is dominance of lemon for the establishment of carotenoids content in fruit flesh, in relation with regulation of expression of genes in carotenoids biosynthetic pathway. The microarray analysis shows a relatively high frequency of non additivity of genomic expression correlated with frequently observed dominance in morphological and biochemical analysis.

Keywords: Citrus, cybrid, allotetraploid, microarray, Real Time PCR, phenotype, transcriptome, aromas, sugars, organic acids, carotenoids.